

マガニン2やトランスポートタン10が誘起する脂質膜中のポア形成の研究

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2014-01-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 有山, 弘高 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.14945/00007495

静岡大学 博士論文

マガイニン2やトランスポーター10が誘起する
脂質膜中のポア形成の研究

2012年1月

大学院自然科学系教育部
バイオサイエンス専攻

有山 弘高

博士學位論文目次

有山 弘高

審査申請論文名

マガイニン2やトランスポータン10が誘起する脂質膜中のポア形成の研究

目 次

第1章 序 論 1頁

- 1. 1 抗菌性ペプチド 1
- 1. 2 膜透過性ペプチド 3
- 1. 3 単一GUV法 4
- 1. 4 研究目的 6

第2章 抗菌性ペプチドのマガイニン2が脂質膜中に誘起するポア形成のキネティックパスウェイ 10頁

- 2. 1 序論 10
- 2. 2 試薬と実験方法 10
- 2. 3 結果 12
- 2. 4 考察 14
- 2. 5 結論 17

第3章 膜透過性ペプチドのトランスポータン10が誘起する脂質膜中のポア形成の研究 25頁

- 3. 1 はじめに 25
- 3. 2 試薬と実験方法 25
- 3. 3 結果 27
- 3. 4 考察 29
- 3. 5 結論 31

学位論文要旨

マガイニン2やトランスポーター10が誘起する脂質膜中でのポア形成の研究

抗菌性ペプチドというのは、細菌などの微生物を殺す活性のあるペプチドで、ヒトなどの脊椎動物や両生類、無脊椎動物、植物などが分泌する。膜透過性ペプチドは細胞の外から中へ透過するペプチドである。その作用を利用して、薬などを細胞の外からうちへ導入することができる。これらの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)のリポソームであるLUVの懸濁液が用いられてきたが、LUV懸濁法では反応の素過程がわからず、物理量は集団の平均値しか求められなかった。それに対し、単一巨大リポソーム法(単一GUV法)では直径10 μm 以上のGUV1個とペプチドの相互作用の結果生じるGUVの物理量や構造の変化をリアルタイムで測定し、同じ条件で多くの“1個のGUV”で実験を行い、それらを統計的に解析することにより反応や構造の素過程の分離や素過程の速度定数を導出する事ができる。本研究では抗菌性ペプチドのマガイニン2と膜透過性ペプチドのトランスポーター10(Tp10)と脂質膜の相互作用を単一GUV法を用いて研究した。

(2章) 脂質膜に結合したマガイニン2がどのようにして脂質膜中に小さな孔(ポア)を形成するかは実験的に全く情報がない。しかし、マガイニン2が誘起する脂質膜中のポア形成のメカニズムを解明するためには、そのポア形成のキネティックパスウェイを明らかにする事が重要である。本研究ではその目的のためにマガイニン2が誘起する大きさの異なる蛍光プローブのGUVからの膜透過をEM-CCDカメラに接続した蛍光位相差顕微鏡を用いて研究した。GUVとしては50%ジオレオイルホスファチジルコリングリセロール(DOPG)/50%ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)の膜を用いた。カルセインの場合であれば100%の膜透過が起こる濃度のマガイニン2を用いた時、テキサスレッド-40k(ストークス-アインシュタイン半径 $R_{SE} = 5.0\text{nm}$)やFITC-BSA($R_{SE} = 3.5\text{nm}$)およびAF-SBTI($R_{SE} = 2.8\text{nm}$)の場合は一過性(10秒以下)の急速な少量(全体の10-20%)の膜透過しか誘起されなかった。一方、TRD-10k($R_{SE} = 2.7\text{nm}$)やTRD-3k($R_{SE} = 1.1\text{nm}$)の膜透過では、初期の一過性の少量の膜透過とそれに続く遅い膜透過が観測された。以上の実験結果より、マガイニン2が膜中に誘起するポアは最初は大きな半径を持つが、その後小さな半径に変化することがわかる。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た。初期状態では単純な拡散により蛍光プローブが膜を透過すると考えて、膜透過速度定数よりポアの有効面積を求めた。初期状態にポアが1個のみできると仮定して求めたポアの半径はマガイニン2濃度が同じである場合は蛍光プローブの種類によらず同じであったが、マガイニン2濃度やGUVの半径の増加と共に増大した。

また定常状態の膜透過の実験から、7 μM マガイニン 2 のときの定常状態のポア半径は、1.4 nm 以上 3.5 nm 以下であることが分かった。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。以上の結果にもとづいてマガイニン 2 が誘起する脂質膜中でのポア形成の新しいメカニズムを提案した。まず水溶液中のマガイニン 2 は GUV の外側単分子膜の膜界面に静電相互作用で結合する。そこからペプチドの界面疎水性を利用して膜界面に深く入り込み外側単分子膜の面積を増大させる。GUV は球形を保つため、内側単分子膜には張力がその面積が増大する方向に働く。その張力の結果、熱揺らぎで膜にポアが形成される。ポア形成後、脂質に結合したマガイニン 2 は拡散によりまずポアの内壁に移動し、その後、内側単分子膜に拡散する。その結果内側単分子膜に張力が先ほどと逆側に働き、ポアのサイズが小さくなり、やがて定常状態のポアができる。

(3 章) Tp10 の脂質膜中のポア形成のメカニズムを解明するために、Tp10 が誘起する蛍光プローブのカルセインの GUV からの膜透過や GUV の構造変化を、EM-CCD カメラに接続した蛍光位相差顕微鏡を用いて研究した。GUV や LUV の膜として、DOPC 膜を用いた。まず蛍光分光光度計を用いて Tp10 が誘起する LUV からのカルセインの膜透過を調べた結果、Tp10 濃度が高くなるほどカルセインの膜透過の速度は急激になり、最終的なカルセインの漏れた量も増加することがわかった。一方、Tp10 とカルセインを含む GUV との相互作用を調べると、カルセインの一過性の大きな膜透過や短い時間での膜透過をくりかえしながら最後に大きな漏れをしめす形式などが観測された。相互作用の時間がたつにつれて、また Tp10 の濃度が高くなるにつれて調べたすべての GUV の中で膜透過が起こった GUV の割合は増加した。以上の実験結果から、Tp10 が誘起するカルセインの膜透過では Tp10 が膜中にポアを誘起する素過程が律速段階であることがわかる。さらに、Tp10 が膜に結合した状態からポアを形成した状態へ 2 状態転移すると仮定してポア形成の速度定数を求めた。また、Tp10 との相互作用により、GUV の大きさが減少する場合があった。一方 Tp10 との相互作用により、GUV の形はチューブが一連真珠形に、楕円体が細いチューブで繋がれた二つの球体に変化した。これらの GUV の変形は可逆的であった。これらの GUV の変形を ADE (Area-Difference Elasticity) 理論により考察すると、GUV の外側単分子膜の表面積が増大したことがわかる。これは Tp10 が GUV の外側単分子膜の膜界面に深く挿入したために生じたと考えられる。この外側単分子膜の表面積増加による表面圧増大がポア形成の 1 つの要因であると考えられる。

第1章 序論

1.1 抗菌性ペプチド

抗菌性ペプチド (AMP; Antimicrobial peptide) とは細菌などの微生物を殺す活性のあるペプチドで、哺乳類を含めた脊椎動物、無脊椎動物や植物などが産生する免疫物質である。アオカビからペニシリンを発見したフレミング (Fleming) と同じくらい初期に、分泌液の抗菌作用が示された (Gill et al., 2009)。1950年代、血液細胞の抗菌活性が発表された (Skarks and Watson, 1957)。感染に対し、食細胞が抗菌性ペプチドを産生する事が発見された (Gill et al., 2009)。1987年、脊椎動物で最初の抗菌ペプチドであるマガイニン2がアフリカツメガエルの皮膚で発見された (Zasloff, 1987)。その後、多くの抗菌性ペプチドが動植物で発見され、現在では500個以上の抗菌性ペプチドが発見されている (Zasloff, 2002)。抗菌性ペプチドは10-50残基のアミノ酸から構成され、数個のアルギニンやリジンを持つものが多いので正味の正電荷をもつ。細菌などの微生物は外側の脂質膜が負に帯電している脂質が多く、静電相互作用により抗菌性ペプチドは強く結合する。一方ヒトなどの真核生物などの細胞膜では外側の脂質単分子膜は負電荷の脂質は存在しない。そのため、抗菌性ペプチドは真核生物の細胞とは強く相互作用しない (Zasloff et al., 2002)。 α -ヘリックス構造をもつものにはマガイニン2、セクロピンA (Cecropin A)、LL-37があり、 β -シート構造をもつものにはプロテグリン1、ラクトフェリシンBなどがある (表1-1)。抗菌性ペプチドは細菌の細胞膜との相互作用が、細菌を殺す主要な原因になるものと、DNAとの相互作用がその重要な原因になるものの2種類に分類できる。たとえば、マガイニン2は細胞膜の脂質膜領域に作用して、抗菌活性を発現すると考えられている。そのことを示す重要な実験結果として、自然界には存在しないD-アミノ酸のみから合成されたマガイニン2はL-アミノ酸からなるマガイニン2と同じ抗菌活性をしめしたことがあげられる (Bessalle et al., 1990)。この結果は、マガイニン2は膜タンパク質であるレセプターには作用せず、生体膜の脂質膜領域と相互作用すること意味している。一方、アジアヒキガエルの胃抽出物から得られたブフォリンII (buforin II) は、細胞膜を通り抜け、細胞質中のDNAや核酸と結合し、抗菌活性を示す。ディフェンシン (defensin) はシステイン基を多く含み、魚類、鳥類、哺乳類などの脊椎動物や昆虫、植物などで見られる。 α -ディフェンシンと β -ディフェンシンは3個のジスルフィド結合を持つ特異的な立体構造を持つ。ヒトの正常状態では小腸、大腸で発現は確認されないが、炎症がおきると、粘膜上皮細胞などで、発現がおきる。キャセリシジン (Cathelicidin) はヒトなどの哺乳類や魚類、爬虫類、鳥類において発見され、好中球や白血球、などで発現している。また、カエルからえられた抗菌性ペプチドの99%が成体由来のものである。マガイニン2などの皮膚抗菌性ペプチドを合成、分泌する皮膚腺は変態がすすまないといけない。変態ホルモンの甲状腺ホルモンにより処理した皮膚は抗菌性ペプチドの発現が上昇する (Iwamuro, 2009)。

抗菌性ペプチドの抗菌活性を示す生物学的指標として、最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration; MIC) がある。MICの測定の際には種々の濃度の細菌に対して抗菌性ペプチドを作

用させ、18時間以上培養する。その後培養液の濁度（又は吸収）を調べ、培養液に目視で確認できる濁度、が見られない最小の抗菌性ペプチド濃度を MIC と定義する。マガイニン2の MIC は 40-50 μ M である (Nanuel, 2009)。オミガナン (omiganan) では 4-8 μ M、インドリシジン (Indolicidin) では 2-16 μ M、セクロピン P1 (Cecropin P1) では 0.3-17 μ M である。また別の指標として、直径が 50-200 nm 程度の一枚膜リポソーム (LUV; Large Unilamellar Vesicle) からの蛍光プローブの漏れを検出する方法もある。

生体膜と抗菌性ペプチドの相互作用について今まで提出されてきたメカニズムの仮説は3つある。1)バレルスティブモデル、2)トロイダルモデル、3)カーペットモデルである。バレルスティブモデルでは数個の α -ヘリックスが脂質膜を貫通し、それらの α -ヘリックス同士が強く相互作用して、ポア（小さな孔）を脂質膜内に形成している。イオンチャネルも一例である。トロイダルモデルでは脂質膜を貫通した α -ヘリックス同士が強く相互作用せず、ポアのところで外側単分子膜と内側単分子膜がつながっている。ポアの内壁は脂質とペプチドにより構成される(Qian et al., 2008)。カーペットモデルではペプチドが界面活性剤のように働き、脂質の一部をペプチドが囲む。このように幾つかの説が提案されているが抗菌性ペプチドと脂質膜の相互作用のメカニズムは解明されていない。しかし、現時点ではどのメカニズムが正しいか、あるいは他のより正しいメカニズムがあるかについては分かっていない。

マガイニン2は23個のアミノ酸残基 (GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS)から成り、C末はアミド化している。電荷の持つ可能性のあるものは4個の Lys、1個の His、1個の N末のアミノ基、1個の Glu であり、中性では約4個の正電荷があることが実験的に示されている。従って、他の AMP 同様負に荷電した細菌の細胞膜の外側の単分子膜に強く結合する。マガイニン2はグラム陰性菌とグラム陽性菌だけでなく、真菌や原生動物も殺す。赤血球などの哺乳類の細胞を溶解するにはマガイニン2は1 mg/mL の高濃度が必要なのに対し、微生物を殺すのには 10-100 μ g/mL しかマガイニン2は必要ではない。つまり細菌と真核生物に対してマガイニン2は非常に高い選択性を持つ。マガイニン2は他の抗菌性ペプチド同様、脂質膜に作用する。マガイニン2はホスファチジルグリセロール (PG)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジックアシッド (PA)、リポポリサッカライド (LPS)などの脂質に強く作用する。一方、電氣的に中性の脂質であるフォスファチジルコリン (PC) やコレステロールにたいしては強く相互作用しない (Matsuzaki, 1998)。マガイニン2の構造は水溶液中ではランダムコイルであり、モノマーであるが、脂質膜に結合すると α -ヘリックスを形成し、脂質膜界面に平行に横たわる (Bechinger et al., 1993)。 α -ヘリックスでは片側が Lys などの親水性残基が集まり、反対側に疎水性のアミノ酸残基が集まる両親媒性構造をとる。疎水性アミノ酸としては Phe など膜界面疎水性の大きなアミノ酸が多い。マガイニン2の抗菌性は、脂質膜にポアを形成することが主因であると考えられている。ポアを通るものとして、ジチオネート (dithionite) (Mw 128)、スクロース (Mw 342)、カルボキシフルオロセイン (Mw 376)、カルセイン (Mw 623)がある。マガイニン2はポア形成時脂質が内側と外側間で流動するといわれている。マガイニン2の正電荷の数をかえた実験では電荷の上昇とともに、負電荷の脂質膜への及着は強くおこる。マガイニン2を利用し、薬への発展も考えられている。

1.2 膜透過性ペプチド

膜透過性ペプチドは細胞膜を透過して、細胞の外から中へ侵入するペプチドである。その作用を利用して、DNA、タンパク質、リポソーム、薬などを細胞の外から内へ導入することができる。膜透過性ペプチドには3つの種類があると考えられている。ひとつは両親媒性のペプチドである。トランスポータン 10 (Tp10) がある。また、中性脂質と負電荷を持つ脂質に作用する。2つ目はペネトラチン (Penetratin)、pVEC、M918 で両親媒性であるが、構成するアミノ酸残基が15個程度の短いペプチドである。3つ目はアルギニンを多く含むペプチドである。R9、TAT(48-60) などが両親媒性ではない。強く負電荷の脂質膜に結合する。また、Penetratin, R7W, TatP59W や TatLysP59W といったペプチドはポアをつくることなく膜を透過するといわれている (Fatemeh et al., 2011)。

膜透過性ペプチドの活性の測定方法としては蛍光プローブや放射性プローブをペプチドに結合させ、細胞とインキュベーションさせた後、洗浄し、結合していないペプチドを取り除き、蛍光強度や放射線量を測定する方法がある。TAT(48-60) に蛍光プローブを結合させ、細胞に添加したところ、細胞の内側に透過した (Vives et al., 1997)。また、LUV 懸濁液法の実験がある。

膜透過性ペプチドの膜透過のメカニズムは幾つか考えられている。ひとつは直接脂質膜を透過するというものである。他にはエンドサイトーシスやピノサイトーシスのように小胞に取り込まれるものがある (Fatemeh et al., 2011)。どの経路の場合でも最終的には膜透過性ペプチドは細胞膜を透過するか、破壊することにより、細胞の中に入る。その膜透過のメカニズムとしては1) 逆ミセルモデル、2) フリップフロップモデル、3) ポア形成モデルが提案されている。逆ミセルモデルでは、ペプチドが外側の脂質膜に結合した後、脂質の疎水性コアでペプチドが脂質の親水性頭部と結合して逆ミセルを作り、その後、内側の脂質膜に結合する (Kawamoto et al., 2011)。フリップフロップモデルでは、ペプチドは外側の脂質単分子膜に結合した後、フリップフロップのように、内側の脂質単分子膜へ疎水性コアを通して移行する。ポア形成モデルでは脂質膜に垂直な方向にペプチドが配向され、ポアを構成しながら、内側の脂質膜へペプチドが移行する (Yandek et al., 2007)。しかし、それらのメカニズムを支持する決定的な実験方法はないので、メカニズムは確定していない。

トランスポータンは、27個のアミノ酸残基 (GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL) からなりC末はアミド化している。電荷を持つ可能性のあるものは4個のLysとN末のアミノ基である。トランスポータンはガラニンの12残基 (GWTLNSAGYLLG) とハチ毒マストパランの14残基 (INLKALAALAKKIL) からなるキメラペプチドで人工的に合成された膜透過性ペプチドである (Pooga et al., 1998)。マストパランは寿命の短いポアを形成し、膜を透過すると考えられている (Pooga et al., 2001)。一般的に元のペプチドとキメラペプチドでは作用が異なる。トランスポータンはラット皮質膜のNa,K-ATPアーゼ (Na,K-ATPase) を阻害するのに対し、ガラニンはそのような効果をもたない。マストパランは阻害効果をもつ。ガラニンはインシュリン分泌を阻害するのに対し、トランスポータンは促進する。ガラニンは海馬でアセチルコリンを誘導を阻害するが、

ガルパランは前皮質でその逆の働きをする。¹²⁵I-ビオチニル-トランスポータンをボースーメラノーマ細胞 (Bowes' melanoma cell) に 37°C で作用させたとき、低い濃度でも細胞に取り込まれた (Pooga et al., 1998)。5 nM では全体の 16.3%、500 nM では 9.2% 取り込まれた。また、10 μM ビオチニル-トランスポータンを 37°C でインキュベートして 1 分後に細胞はアビジン蛍光プローブで染まる。5 分後には細胞膜と、細胞質の膜にペプチドは移行する。核もわずかに染色される。15-30 分後には核膜に集中する。一方、0°C で 30 分、10 μM ビオチニル-トランスポータンと細胞をインキュベートすると、主に細胞膜にペプチドはみられる。これらは Hela、HEK293、SAOS-1、CaSki、U973、COS、Jurkat、Rinm5F などの細胞でも同様に起こる。つまり膜透過は細胞の種類によらない。ビオチニル-トランスポータンはアクチン、β-チューブリン、サイトケラチンなどとは同じ場所に存在しない。細胞骨格とは結合しない。ボースーメラノーマ細胞を 0.5 M スクロース中に置くと、エンドサイトーシスは起きない。トランスポータンはこの細胞の膜を透過する。低温、または 0.5 M スクロース下というエンドサイトーシスの起こらない環境での膜透過は、トランスポータンはエンドサイトーシスで細胞の中に移行するのではないことが示している (Pooga et al., 1998)。また、トリプシン処理したペプチドが膜を透過しないのに対し、細胞にペプチドを作用させたのち細胞をトリプシン処理したものでは膜透過している。これは細胞膜に結合しているだけではないことを示唆する。マストパランは GTP アーゼ (GTPase) 活性を増加させるが、トランスポータンはボースーメラノーマ細胞において GTP アーゼ活性を阻害する (Pooga et al., 1998)。トランスポータン処理したのちの細胞を破壊したものの電気泳動により、トランスポータンは分解されていないことがわかっている。Tp10 はトランスポータンの N 末側のアミノ酸を削った 21 残基 (AGYLLGKINLKALAALAKKIL) のペプチドであり、Tp10 はトランスポータンの膜透過性能をもち、GTP アーゼ阻害を小さくしたものである (Soomets, 2000)。LUV に蛍光プローブ ANTS と消光剤 DPX を入れて置き、それに対し、Tp10 を作用させることにより漏れのメカニズムを調べている (Yandek et al., 2007)。ANTS と DPX の漏れの速度定数が違うことを利用し、両方の物質が完全にもれるか (all or none) あるいは全体の LUV でゆっくりと漏れが起こるか (gradual) が調べられている。Tp10 を ANTS と DPX を内部に含む LUV と相互作用させた後、LUV 懸濁液に DPX を加え、LUV の外側の ANTS の蛍光を消光する。消光後の Tp10 の作用前と後で蛍光強度に差がなければ、LUV 内での ANTS と DPX の比は同じということになり、all or none の漏れの形式を示している。実験の結果として、Tp10 が誘起する蛍光プローブの漏れは all or none ではなく gradual であると論じられている。

3 単一-GUV法

従来の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 (50-200 nm) の LUV が多く存在する懸濁液を用いて蛍光分光法、光散乱、電子スピン共鳴 (ESR) などの種々の物理的測定法が行われてきた (LUV 懸濁法)。しかし、LUV 懸濁法の実験では反応の素過程がわからず、物理量は集団の平均値しか求められなかった。最近、山崎ら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) を提案した。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、リアルタイムで観測し、同じ条件で多くの「1 個の GUV」で実験を行い、それらを統計的に解析することにより反応や構造の素過程の分離や素過程の速度定数を導出することができる (Yamazaki, 2008)。単一 GUV 法により、リポソームの膜融合 (Tanaka and Yamazaki, 2004) や膜分裂 (Tanaka et al., 2004)、抗菌ペプチドマガイニンによるポア形成 (Tamba and Yamazaki, 2005; Tamba et al., 2009) などの実験を行い、LUV 懸濁液法では得られない新しい質の情報が得られている。

LUV 懸濁液法によるリポソーム内容物の膜透過 (又は漏れ) の実験は生体膜や脂質膜とペプチド、タンパク質などの外来物質との相互作用の研究に非常に良く使用されてきた。LUV に高濃度のカルセインを入れておくと、自己消光により蛍光は小さい。しかし、LUV からカルセインが漏れると、自己消光が解消されるため、蛍光強度が増大する。マガイニン2をカルセイン入り LUV 懸濁液に添加すると、時間とともに蛍光強度が増大した。また、マガイニン2の濃度が増大するとともに、蛍光強度は増大した。これは、LUV からカルセインが漏れたことを示唆している。一般にリポソームからの内容物の漏れ (つまり膜透過) が起こる原因として、1)膜融合などの膜構造変化による膜不安定化、2)ポアやイオンチャネルの形成、3)リポソームの破裂などが考えられる。最近、抗菌性ペプチドによるリポソーム内部の物質の漏れを測定する単一 GUV 法が開発された (Tamba and Yamazaki, 2005)。細菌の細胞膜を模倣して、電気的に正味の負電荷を持つ脂質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) が 50%mol/50%mol の割合の脂質膜の GUV が用いられた。GUV はその内部に 1 mM カルセインと 0.1 M スクロースを含み、GUV の外部は 0.1M グルコースを含む PIPES 緩衝液がある。蛍光顕微鏡下で1個の GUV を選択し、その近傍へマガイニン2の水溶液が入ったマイクロピペット (直径 20 μm) を近づけ、マイクロピペット内部の圧力を少し陽圧にすることによりマガイニン2の水溶液を静かに観察している1個の GUV の近傍に添加する。マガイニン2を添加し始めてからある時間までは蛍光強度は一定だが、その後蛍光強度は急激に減少し、30秒以内に0になった。このときの位相差顕微鏡像は GUV の膜のみが保持され、コントラストはなくなっている。またこの間、GUV の変形や大きさの変化、および GUV の会合や膜融合や膜分裂などは観察されなかった。従って、このことは脂質膜中にポアが形成され、そのポアを介してスクロースとカルセインが漏れたことを示している。従って、GUV 内部の蛍光強度が急速に減少し始めた時刻が、マガイニン2が脂質膜中にポアを形成し始めた時刻である。単一 GUV では同じ条件で多くの「1 つの GUV」で実験が行われる。マガイニン2のポア形成による蛍光強度の減少が始まる時刻は GUV ごとにランダムであるが、どの GUV でも蛍光強度の減少開始から 30 秒以内に蛍光強度は 0 になった。これはポア形成が確率過程であることを示している。漏れが確率的に起こるため、確率の概念が導入されている。GUV がマガイニン2と相互作用し始めてから t 秒後に、漏れが起こっていない GUV の数を調べたすべて GUV の数で割ったものが $P_{\text{intact}}(t)$ と定義された。 $P_{\text{intact}}(t)$ は時間とともに減少した。ここで、マガイニン2が脂質膜界面に結合してまだ漏れが起こっていない状態を B 状態、ポアを形成した状態を P 状態とする。マガイニン2によるポア形成の過程として、B

状態から P 状態へ転移するという 2 状態転移モデルが提案された。B 状態の割合は調べた GUV の中で蛍光プローブが漏れていない GUV の割合、 $P_{\text{intact}}(t)$ 、に等しい。B 状態から P 状態への転移の速度定数 k_p 、つまり、ポア形成の速度定数 k_p は $P_{\text{intact}}(t)$ の時間変化の解析によって求まる。2 状態転移の場合は以下の式が成り立つ。

$$P_{\text{intact}}(t) = \exp(-k_p(t - t_{\text{eq}})) \quad (1-1)$$

$P_{\text{intact}}(t)$ の時間変化のグラフは上の式で良くフィティングされ、速度定数 k_p が求まった。マガイニン 2 濃度が増加するとともに、 k_p は増大した。

次にマガイニン 2 が誘起する脂質膜中のポア形成の膜表面電荷依存性が調べられている (Tamba and Yamazaki, 2009)。膜表面電荷を変えるために DOPC と DOPG の混合膜において電氣的に負電荷をもつ DOPG の濃度を変えられている (DOPG 濃度として 30mol% から 60mol% まで)。負電荷の密度が低い膜ではポア形成が起こりにくい。0.007 s⁻¹ の k_p を出すのに必要なマガイニン 2 の水溶液中濃度は 60% と 30% DOPG では 50 倍違う。 $P_{\text{LS}}(6\text{min}) = 0.5$ となるマガイニン 2 の水溶液中濃度は 60% DOPG、50% DOPG、40% DOPG、30% DOPG では 2.3、4.5、25、80 μM となる。しかし、水溶液中の静電相互作用の理論 (ポアソン-ボルツマン理論) と水溶液から膜界面へのマガイニン 2 の結合定数を用いて、水溶液中のマガイニン 2 濃度を脂質膜界面のマガイニン 2 濃度 X に変換すると、 k_p の X 依存性のグラフは膜の脂質の組成によらず、ほぼおなじ曲線上にのる (k_p vs X のグラフはほぼ直線)。この実験結果は脂質膜に結合したマガイニン 2 の濃度がポア形成の速度定数を決定していることを示している。

マガイニン 2 が脂質膜の構造に与える影響を調べるために GUV の変形の研究が行われている (Tamba and Yamazaki, 2005)。マガイニン 2 をチューブ形の GUV に添加すると、中央がくびれていき、一連真珠形になる。また、楕円体の GUV は細いチューブでつながれた二つの球形の GUV になる。これらの変形は ADE (Area-Difference Elasticity) モデル (Heinrich et al., 1993; Mial et al., 1994) によって説明される。ADE-モデルは細胞やリポソームなどの形を決定する理論として最も有力なものである。一般に曲げ弾性エネルギーと伸びの弾性エネルギーの和である GUV の弾性エネルギーを最小とするようにリポソームなどは変形する。体積一定の条件では、外側単分子膜の表面積と内側単分子膜の表面積の差が重要になる。その値が上昇するにつれて、上記のような変形が起こる。つまり、マガイニン 2 は内側と外側の表面積の差を増大させることが ADE モデルから考えられる。これはマガイニン 2 が外側単分子膜に吸着し、深く膜界面に入って外側の単分子膜の面積を増加させたことを意味している。

4 研究目的

この論文では、抗菌性ペプチドのマガイニン 2 と膜透過性ペプチドのトランスポーター 10 と脂質膜の相互作用を単一 GUV 法を用いて調べた。

(2章) マガイニン2の脂質膜中のポア形成のメカニズムを解明するためには、そのポア形成のキネティックパスウェイを明らかにする事が重要である。そのためにマガイニン2が誘起する脂質膜中のポアの大きさやその時間的变化を明らかにすることを試みた。平衡状態でのポアの大きさを測定する方法はあるが、ポアの大きさの速い時間変化を測定する方法は今まで存在しなかった。ここでは大きさの異なる蛍光プローブの1個のGUVからの膜透過の速度の時間変化を測定することにより、ポアの大きさの時間変化を測定することを試みた。単一GUV法をもちいて50%DOPG/50%DOPC膜においてさまざまなおおきさの蛍光プローブを使用した。蛍光プローブとして、様々な平均分子量(1500-70kまで)をもつテキサスレッドデキストラン(TRD)とエフアイティーシーアルブミン(FITC-albumin)、アレキサフルオロトリプシンインヒビター(AF-SBTI)を使用した。これらの蛍光プローブはすべて水溶液中の拡散定数の測定により、ストークス-アインシュタイン半径が実験的に求まっている。マガイニン2が誘起するこれらの蛍光プローブのGUVからの漏れ(膜透過)の速度定数を解析することにより、マガイニン2が誘起するポアの大きさが時間と共に変化する事を発見し、それにもとづいてポア形成のメカニズムを提案した。

(3章)Tp10と脂質膜の相互作用の研究ではLUV懸濁液法が今までおこなわれてきた(Yandek et al., 2007)。しかし、それでは物理量の平均値のみしか情報は得られず、反応の素過程や速度定数などの情報は失われてきた。Tp10が誘起する蛍光プローブの膜透過の素過程やメカニズムを解明するために、Tp10と脂質膜の相互作用を単一GUV法で調べた。脂質膜としては電氣的に中性であるDOPC膜を用いた。DOPCのみではバッファー中ではGUVが作成できないので、PEG-lipid法を用いた(Yamashita et al., 2002)。PEG-lipid法では少量のPEG-lipid(ここではジオレオイルホスファチジルエタノールアミン-N-ポリエチレングリコール2000(PEG2K-DOPE))を膜に添加することにより高イオン濃度下でもGUVが作成できる。また、GUVを固定するために脂質中にビオチン-X-ジヘキサノイルホスファチジルエタノールアミン(biotin-X-DHPE)を加え、ガラス上でビオチン-BSAに結合したストレプトアビジンと結合させた。Tp10が誘起するカルセインのもれやGUVの構造変化を単一GUV法により研究し、Tp10が誘起する脂質膜のポア形成の特性を研究した。Tp10が誘起するGUVの大きさの変化についても調べた。以上の実験結果にもとづいてTp10が誘起する脂質膜中のポア形成の特性やメカニズムを考察した。

Structure	Name of AMPs	origin	Number of aa	Positive aa
α -helix	Cecropin A	Silk moth	41 aa	6K+1R
	Magainin 2	frog	23	4K
	Dermaseptin 1	frog	41	4K
	LL-37	human	41	4K+4R
	Buforin II	vertebrate	22	1K+4R
	PGLa	frog	21	4K
1 S-S bond	Bactenesin 1	Cow	12	4R
3 S-S bond	α -defensin	human	30	4R
	β -defensin	Cow	38	5R
β -sheet	Protegrin-1	Porcine	18	6R
	Lactoferricin B	Bovine milk	15	2K+5R
linear, non- α -helix	indolicidin	Cow	13	1K+2R

表 1-1

抗菌性ペプチドの種類と特性

structure	Name of CPPs	Number of aa	Positive aa
amphiphilic	Tp10	21aa	4K
short amphiphilic	penetratin	16	3R+4K
	pVEC	18	4R+2K
	M918	22	7R
hydrophilic	R9	9	9R
	TAT(48-60)	13	6R+2K

表 1-2

膜透過性ペプチドのまとめ

第2章 抗菌性ペプチドのマガイニン2が脂質膜中で誘起するポア形成のキネティックパスウェイ

2-1 序論

抗菌性ペプチド (AMP) は細菌を殺す作用をもち、両生類、無脊椎動物、植物、哺乳類の組織で発見、単離されている。マガイニン2は脊椎動物では最初に発見された AMP である (Zasloff, 2002; Hwang and Vogel, 1998)。マガイニン2はアフリカツメガエル *Xenopus laevis* で単離され (Zasloff, 1987; Zasloff et al., 1988)、LUV 懸濁液や X 線回折などで研究されてきた (Matsuzaki et al., 1995; Boggs et al., 2001; Gregory et al., 2009; Ludtke et al., 1996; Yang et al., 2000)。D-アミノ酸だけのマガイニン2を作成したら、L-アミノ酸とほぼ同じ活性を示した (Wade et al., 1990)。一次構造ではリジン残基を4個持ち、二次構造では膜界面に結合した時、 α -ヘリックスをとる。マガイニン2は脂質膜に直接作用し、膜に穴をあけることでその抗菌作用を果たしていると考えられている。蛍光物質を入れた LUV ではマガイニン2により全体の LUV からゆっくりと蛍光物質が漏れると考えられてきた。しかし、単一 GUV 法を用いた研究により、マガイニン2は一過性の大きな漏れを引き起こすことが分かった。漏れは確率的であり、濃度とともに GUV からカルセインの漏れた GUV の確率は増大する (Tamba and Yamazaki, 2005)。また、マガイニン2のポア形成の速度定数はマガイニン2の膜表面濃度で決まることが単一 GUV 法の研究により分かった (Tamba and Yamazaki, 2009)。マガイニン2が形成するポアの構造としてはトロイダル構造 (toroidal model) とバレルースティブ構造 (barrel-stave model) が考えられている (Melo et al., 2009)。最近の分子動力学シミュレーションはトロイダル構造を支持している (Leontiadou et al., 2006)。

膜に結合したマガイニン2がどのようにして脂質膜中にポアを形成するかは実験的に全く情報がない。しかし、マガイニン2の脂質膜中のポア形成のメカニズムを解明するためにはそのポア形成のキネティックパスウェイを明らかにする事が重要である。本研究ではその目的のために単一 GUV 法を用いてマガイニン2が誘起する大きさのことなる蛍光プローブの GUV からの膜透過を研究した。その結果マガイニン2が誘起するポアの大きさが時間と共に変化する事を発見し、それにもとづいてポア形成のメカニズムを提案した。

2-2 試薬と実験方法

2-2-1 試料

ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (DOPG) はアヴァンチ社より、テキサスレッドデキストラン (平均分子量はそれぞれ

3000, 10000, 40000, 70000)(TRD-3k, TRD-10k, TRD40k, TRD70k), フルオレセインイソチアネートボヴァインセラムアルブミン (FITC-BSA), トリプシンインフロムソイビーンアレクサフルオロ 488 コンジュゲート (AF-SBTI)はインビトロゲン社より購入した。牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) は和光純薬工業 (株) より購入した。

2.2 ペプチドの合成と精製

マガイニン 2 はペプチドシンセサイザー 433A (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて FastMoc 法により合成した。配列は GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS でカルボキシル末端がアミド化されている。1 mmol の Fmoc-L-アミノ酸をカートリッジにつめて使用し、ペプチドを固定するレジンとしては 0.1 mmol のアミド化レジンを使用した。活性化剤として、132 mL DMF に 25 g HATU を溶解させたものを用いた。

合成されたペプチドをレジンから切り離すために、10 mL トリフルオロ酢酸 (TFA)、250 μ L 1, 2-エタンジチオール、500 μ L ミリ Q、500 μ L チオアニソール、0.75g 結晶フェノールの混合液体とペプチド樹脂 100 mg を 3 時間室温で反応させ、その後、ガラスウールでろ過することによりレジンを取り除いた。ろ液であるペプチドの TFA 溶液に tert-ブチルメチルエーテル (MTBE) を 60 mL 加えて、ペプチドを沈殿させ、その後沈殿を 3 mL ミリ Q を用いて溶解した。その水溶液を凍結乾燥することによりペプチドの粗精製物を得た。逆相カラム (ナカライ COSMOSIL 5C18-AR 10 \times 250mm) を用いて HPLC (島津、SPD-20A, LC20AT) によりペプチドを精製した。HPLC の溶媒 A は 0.1% TFA を含むミリ Q であり、溶媒 B は 0.1% TFA を含む 90% アセトニトリル/10% ミリ Q である。1 分間に 0.5% 溶媒 B が上昇するグラジエントをかけて精製した。精製されたマガイニン 2 溶液は凍結乾燥した。

精製されたマガイニン 2 はエレクトロスプレー質量分析器を用いて分子質量を得た。得られた質量は 2465 \pm 1 であり、目的物であるマガイニン 2 の平均分子量に相当している。

2-2-3 単一 GUV 法による実験方法

GUV は脂質の薄い層を水溶液中で静かに水和させることにより得る。クロロホルムに溶解した 1 mM のリン脂質の混合溶液 (50mol% DOPC/50mol% DOPG) をガラス製のサンプル管に 200 μ L 加え、室温で窒素ガスを用いて乾燥し、薄い混合膜の脂質フィルムを作製した。さらに回転式真空ポンプにつないである真空デシケーター中に 10 時間以上おき、クロロホルムを完全に乾燥した。乾燥した脂質膜フィルムに 10 μ l の水をのせ、50 $^{\circ}$ C で 5 分間のプレハイドレーションをおこなった。その後、1 ml の 0.1M スクロースと蛍光プローブを含む緩衝液 A (10 mM PIPES (pH7.0), 150 mM NaCl, 1 mM EGTA) をサンプル管に加え 37 $^{\circ}$ C で 2 時間静置した。蛍光プローブとしては TRD-3k、TRD-10k、TRD40k、

TRD-70K、FITC-BSA、AF-SBTI を使用した。

水溶性の蛍光プローブを内包した GUV はゲル濾過法を用いて GUV 内外にある蛍光プローブを取り除き精製をした。まず、上記の方法で作製した懸濁液に含まれる脂質の塊や多重層リポソーム (MLV) を取り除くため GUV 懸濁液を遠心分離 (12000 rpm、15 分間、20 °C) した。次に GUV に内包されなかったカルセインを取り除くために、遠心後の試料の上澄み液をセファデックス G75-カラム (面積 27.7 cm² × 高さ 5.5 cm; 容積 49.5 cm³) でゲル濾過した。カルセインの大きさは GUV に比べて非常に小さく、カルセインはゲルの内部の奥にまで入り込み、カラム中のゲルを通り抜けるスピードが GUV に比べて遅くなる。これを利用して GUV と GUV に内包されなかったカルセインを分離することができる。

蛍光位相差顕微鏡は IX-70 (オリンパス) を使用した。蛍光位相差顕微鏡での観察では、スライドガラスの上に手製のシリコンスペーサー (コの字型のシリコンシート、3 mm × 10 mm × 12 mm、容積 350 μL) をおきカバーガラスをその上にのせたチャンバーを用いた。その際に、ガラスと GUV が相互作用を起こして GUV がガラスに接着しないようにするために、あらかじめ 1 mg/mL のウシ血清アルブミン (BSA) 水溶液を 300 μL 入れてガラスをコーティングしておいた (BSA コーティング)。顕微鏡に取り付けられた EM-CCD カメラ (浜松ホトニクス; EM-CCD, C9100) をパソコンにつないで、実験の過程を録画し、画像解析ソフト AQUACOSMOS (浜松ホトニクス) で解析を行った。

マガイニン 2 の水溶液を一個の GUV に添加するためにマイクロピペットを用いた。マイクロピペットは内径 1.0 mm のガラス管 (G-1, Narishige) を微小管製作器 (PP-83, Narishige, Tokyo, Japan) で細く伸ばし、ダイヤモンドカッターでガラスに傷をつけて切断することにより作製した。実験では 20 μm 程度の直径を持つマイクロピペットを用いた。マイクロピペットは三次元水圧マイクロマニピュレーター (Narishige, NMW-23) に固定され三次元方向に任意で操作できる。

水溶液中のマガイニン 2 濃度は、マガイニン 2 のアミノ酸配列中に含まれる Phe 残基が 260 nm の波長の光を吸収することを利用し、マガイニン 2 の濃度と 260 nm の波長に対する吸光度の検量線を作製し、それを用いてマガイニン 2 の濃度を決定した。マガイニン 2 は 0.1 M グルコースを含む緩衝液 A 中に溶解させ、マイクロピペットで GUV に添加した。

2-3 結果

2-3-1 マガイニン 2 が誘起する TRD-3k の GUV からの漏れ

TRD-3k とは平均分子量 1500 のデキストランに蛍光プローブのテキサスレッド が結合したものである。ストークス-アインシュタイン半径 (拡散定数からもとめられる物質の半径; R_{SE}) は 1.4 nm である (Goins et al., 2008; Venturoli and Rippe, 2005)。図 2.1 は 7 μM

マガイニン 2 と内部に TRD-3k を含む 50% DOPG/DOPC の相互作用を示している。図 2.1 の(A)(1)はマガイニン 2 の添加前の GUV の位相差像であり、GUV の内部が 0.1 M スクロース溶液と外部が 0.1 M グルコースであるため位相差が生じ、高いコントラストが生じている。GUV の内部の蛍光強度は 170 秒間は一定で、その後急速に減少し、220 秒後では最初の蛍光強度の 10%以下だった (図 2.1(B))。ポアは 171 秒辺りで形成されたと考えられる。一方マガイニン 2 添加後の GUV は膜のみが観察され、コントラストは大きく減少した (図 2.1(C))。これはマガイニン 2 により、GUV の内側からスクロースがもれ拡散し、また外側からグルコースが流入することで GUV 内外に物質の差がなくなったことをあらわしている。また、膜の形はおなじみであり急激な蛍光強度の減少が始まったときにポアが形成されたと考えられる。したがって、この現象は膜の破裂や欠損などではなく、脂質膜中に小さな孔(ポア)が生じ、そこから蛍光プローブやスクロースがもれたと考えられる (Tamba and Yamazaki, 2005)。また、多くの GUV に対して実験したが、結果は同様で、ポア形成から約 100 秒間で TRD-3k の 90%が漏れでたことがわかった (図 2.1C)。多くの調べた 1 個の GUV の中で蛍光プローブの漏れていない割合、 $P_{\text{intact}}(t)$ 、の時間変化は図 2.1(D)のようになり、次式の指数関数でフィッティングできた。

$$P_{\text{intact}}(t) = \exp\{-kp(t - t_{\text{eq}})\} \quad (2-1)$$

ここで kp はポア形成の速度定数、 t_{eq} はフィッティングパラメーター。 t_{eq} はマガイニン 2 が GUV の膜に結合して、平衡状態になるまでの時間である (Tamba and Yamazaki, 2005)。このとき kp は $0.014 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$ であらわされた。

2-3-2 TRD-10k の GUV からの漏れ

TRD-10k とはデキストランにテキサスレッドが結合したもので平均分子量 10000 からなる ($R_{\text{SE}} = 2.7 \text{ nm}$) (Goins et al., 2008)。図 2.2(A)は $7 \mu\text{M}$ マガイニン 2 と TRD-10k を含む 50% DOPG/DOPC-GUV の相互作用を示す。GUV の内部の蛍光強度は減少した。 $7 \mu\text{M}$ マガイニン 2 を添加したとき、蛍光強度は数秒間急速に減少後、ゆっくりと減少した。TRD-10k が GUV からの漏れはじめてから、100 秒の間に、60%が漏れた。多くの GUV に対して実験したが、結果は同様で、二相性の蛍光強度減少を示した (図 2.2A)。

$4 \mu\text{M}$ マガイニン 2 では二相性の蛍光強度減少をもっとはっきりとめした (図 2.2 B)。対照的に $15 \mu\text{M}$ マガイニン 2 では、最初の急速な 5 秒間の漏れで TRD-10k の 70%がもれ、その後ゆっくりとしたもれが起こった (図 2.2C)。

2-3-3 マガイニン 2 が誘起する FITC-BSA, TRD-40k, TRD-70k の GUV からの漏れ

FITC-BSA の R_{SE} は 3.6 nm 、TRD-40k は分子量が 35000-50000 で R_{SE} は 5.0 nm 、

TRD-70k は分子量 60000-90000 で R_{SE} は 6.4 nm である (Goins et al., 2008)。図 2.3A のように、15 μ M マガイニン 2 を FITC-BSA 入りの GUV に添加すると、蛍光強度は短く 5 秒間程度の一過性のわずかな減少を示した。減少率は 10%程度だった。それ以降はまったく減少しなかった。一方、位相差像の観察からスクロースは 100%もれていた。TRD-40k や TRD-70k でも同様の結果がえられた。

2-3-4 AF-SBTI の GUV からの漏れ

AF-SBTI は R_{SE} は 2.8 nm である (Gribbon and Hardingham, 1998)。15 μ M マガイニン 2 による AF-SBTI の GUV からの漏れは初期状態と定常状態の二相性を示し、TRD-10k と類似していた。最初の急速な漏れの後に、ゆっくりとした漏れが続き、100 秒間で AF-SBTI の 70%がもれた。(図 2.3B)

一方 7 μ M マガイニン 2 では FITC-BSA 同様、急速な、一過性のわずかな漏れを示した。その後は蛍光強度は変化しなかった。

2-4 考察

2.4.1 マガイニン 2 が誘起する種々の大きさの蛍光プローブの漏れ

実験結果は GUV からの蛍光物質の漏れが物質の大きさによることを示した。TRD-3k、TRD-10k、AF-SBTI のような比較的小さな蛍光物質は最初に急激な一過性の漏れを示したあと、ゆっくりとした漏れが続いた。つまり漏れ方が初期状態と定常状態の二相性であった。一方、TRD-40k、TRD-70k、FITC-BSA のような大きな蛍光物質では蛍光物質の 10-20% 程度の小さな急激な漏れを 10 秒間示した。

2.4.2 蛍光プローブの漏れの定量的解析

蛍光物質の漏れの数値定数、 k_{leak} は次の式で決定される。

$$C^m(t) = C_0^m \exp(-k_{leak}t) \quad (2-2)$$

$C^m(t)$ は時刻 t における GUV 内の蛍光物質の濃度、 C_0^m はポア形成前の GUV 内の蛍光物質の濃度を示す。漏れる前の蛍光強度と漏れが起こってから t 秒後の蛍光強度を $I(0)$ 、 $I(t)$ とおくと蛍光物質の濃度と蛍光強度はほぼ比例するので、つぎの式が成り立つ。

$$C^m(t)/C_0^m = I(t)/I(0) = FI \quad (2-3)$$

FI の対数の時間変化の曲線から漏れの速度定数 k_{leak} を定量的にもとめることができる。図 2.4 に典型的な実験結果を示した。ポア形成した後の初期状態と最終的な定常状態はふたつの直線で近似できる(図 2.4)。それぞれの直線の傾きより、初期状態の漏れの速度定数 $k_{leak}^{initial}$ 、と定常状態の漏れの速度定数、 k_{leak}^{steady} が求まった。4 μM マガイニン 2 では TRD3-k の場合、 $k_{leak}^{initial} = 1.2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ および $k_{leak}^{steady} = 4.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ で $k_{leak}^{initial}$ が k_{leak}^{steady} より 40 倍大きかった。TRD-10k の場合 $k_{leak}^{initial} = 5.5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ および $k_{leak}^{steady} = 2.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ であった。

TRD-40k や FITC-BSA のような大きなサイズの蛍光プローブは初期状態の漏れのみ起こり、最終的な定常状態の漏れがどのマガイニン 2 濃度でも観測されたのは TRD-3k と TRD-10k のみであった。また、7 μM 以下のマガイニン 2 で TRD-10k がゆっくり漏れたのは、TRD-10k において分子量の分布があったためだと考えられる。AF-SBTI は 7 μM 以下のマガイニン 2 で定常状態において漏れなかった。これらのことから、定常状態においてポアの大きさは 7 μM 以下のマガイニン 2 では 2.8 nm より小さく 1.4 nm より大きいといえる。一方 15 μM マガイニン 2 の場合は、AF-SBTI の定常状態の漏れをひきおこしたことから、ポアの大きさは、2.8nm(SBTI の R_{SE})より大きく、3.6 nm (BSA の R_{SE})より小さい。つまりこの結果、定常状態におけるポアの大きさは濃度と共に増大することがわかる。

初期状態は漏れの速度定数が大きいので単純な拡散により蛍光プローブが漏れると考えられる。まず蛍光プローブの流速 J は、フィックの式より (Schultz, 1980)、

$$J = -P(C^{in}(t) - C^{out}(t)) = -\frac{D}{h}(C^{in}(t) - C^{out}(t)) \quad (2-4)$$

とかける。ここで h は膜の厚さで、 P は膜透過係数である。GUV の外部は体積が非常に大きく、GUV の内部から漏れてきた蛍光プローブは拡散するので、 $C^{out}(t)$ は 0 と近似できる。よって、

$$\begin{aligned} V \frac{dC^{in}}{dt} &= -\frac{D}{h} S_p C^{in} \\ \frac{C^{in}(t)}{C^{in}(0)} &= \exp(-k_{leak} t) \end{aligned} \quad (2-5)$$

ここで S_p はポア領域の有効面積、 D はポア内での物質の拡散定数、 V は GUV の体積である。

$$k_{leak} = \frac{DS_p}{hV} \quad (2.6)$$

一方、拡散定数 D とストークス-アインシュタイン半径 R_{SE} の間には以下の関係が成り立つ (ストークス-アインシュタインの式)。

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_{SE}} = \frac{2.45 \times 10^{-19}}{R_{SE}} m^2 s^{-1} \quad (2.7)$$

ここで k はボルツマン定数、 T は絶対温度、 η は水溶液中の粘性係数である。(2.6)式を用いて実験より求めた漏れ速度定数 k_{leak} より、 S_p を求めた (表 1A, 表 2A)。

表 2.1A にかいてあるように、初期状態においては蛍光物質によらず、 S_p はほぼ同じ大きさとなった。そして、マガイニン 2 の濃度の増加とともに大きくなった。 D の値はポア中の水とバルク中の水では摩擦のため、異なる。そのため S_p の値にも誤差が生じる。最初のポアにおいてはポアが大きいので、摩擦は少ないとして S_p の値を使用した。次に、初期状態のポアは 1 つと仮定して、ポアの半径を計算した (表 2.1A)。

2.4.3 マガイニン 2 が誘起するポア形成のメカニズムの仮説

ポア形成の機構について考察する。まず、マガイニン 2 の正電荷と DOPG の負電荷の静電相互作用によりマガイニン 2 が外側単分子膜の界面に結合する。膜界面ではマガイニン 2 は α -ヘリックスを形成し、膜面に平行に配置する。マガイニン 2 を構成する Phe などのアミノ酸は膜界面疎水性が高いので、マガイニン 2 は膜界面に深く挿入することができ、その結果、膜の外側単分子膜の表面積を増大させる。マガイニン 2 が結合したとき、GUV の形は球形のまま保たれる。そのためには、内側の単分子膜は外側の単分子膜と同じ面積になる必要がある。その結果、内側の単分子膜も表面積を広げるように張力がかかる (図 5(i) の矢印がこの張力を表わす)。膜にかかる張力はマガイニン 2 の表面積とともに増大する。外力により生じた膜にかかった張力により、膜の横方向の密度の熱揺らぎの結果、ポアが形成されることは知られている (Sandre et al., 1999; Karatekin et al., 2003) (Evans et al., 2003)。内側単分子膜は熱揺らぎによる小さな脂質の欠損部位が出来ては消える (図 5(ii))。そうしたのち、それが大きくなり、その結果膜にポアが形成される。ポアは出来た瞬間から、外側に引っ張られ、ポアの半径は大きくなる。(図 5(ii)) その後時間がたつと、広がりすぎたポアを閉じる方に力が働きポアは小さくなる。そして別のポアがその他幾つかの場所に出来る。

使われた蛍光物質の種類に関係なく、同じ濃度のマガイニン 2 に対して、同じポアの大きさを示した。マガイニン 2 の濃度が増加するとともにポアの大きさも増大した。また、GUV の大きさが増加するとともに、ポアの大きさも増大した。以前なされた研究 (Tamba and Yamazaki, 2009) のように、外側脂質分子あたりのマガイニン 2 濃度が 60 mmol/mol がポア形成に必要である。イオンチャネルやポア形成をする毒たんぱく質のような特殊なやり方ならば、これほどの高い濃度は必要とされなかったであろう。

2.5 結論

マガイニン2が誘起するポアを介しての種々の大きさの異なる蛍光プローブの漏れの解析から漏れの数値定数を求めた。マガイニン2が誘起するポアにおける蛍光プローブの漏れの数値定数は初期状態では非常に大きい、その後小さくなり、やがて定常状態の数値定数になった。この結果よりマガイニン2は最初脂質膜に大きなポアを一過性に開けるが、その後ポアの半径は時間と共に小さくなり最終的には安定な小さい半径のポアに変化する事が推測される。マガイニン2のポア形成のメカニズムの仮説を新たに提唱した。

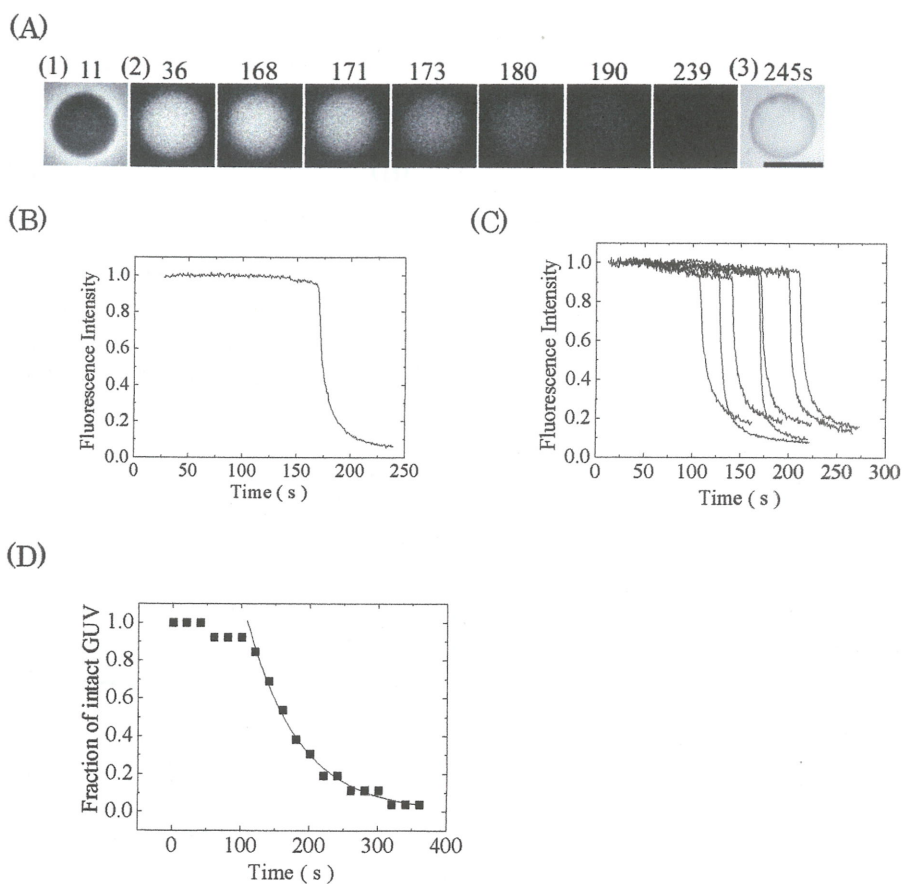


図 2.1 マガイニン 2 による TRD-3k の 50% DOPG/DOPC-GUV からの漏れ
 マガイニン 2 の濃度は $7 \mu\text{M}$ 。 25°C で実験を行った。

(A)(1)と(3)は位相差像(2)は蛍光顕微鏡像

11 秒(1)の時のコンストラクトが 245 秒(3)ではなくなっている。膜の形は保持されている。

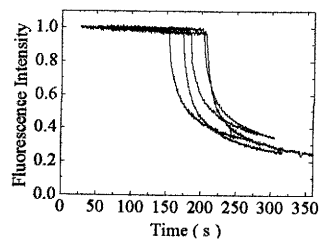
(B)(A)の GUV 内部の規格化した蛍光強度の時間変化

(C)他の GUV 内部の規格化された蛍光強度変化

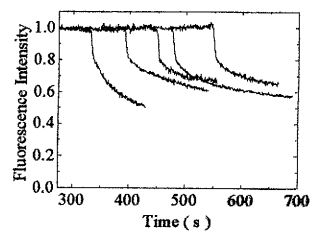
1 本の曲線は 1 個の GUV の結果を表す

(D)50%DOPG/DOPC-GUV の R_{intact} の時間変化。曲線は式(2.1)で最もよくフィットした場合の結果を表す

(A)



(B)



(C)

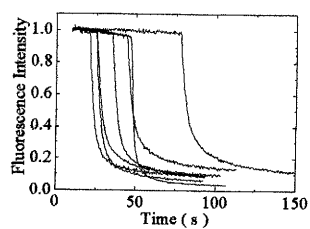


図 2.2 マガイニン 2 による TRD-10k の 50% DOPG/DOPC-GUV からの漏れ
マガイニン 2 との相互作用により誘起された GUV ないの蛍光強度(規格化したもの)の時間
変化 1 個の曲線は 1 個の GUV の結果を表す。

(A)7 μM、(B)4 μM、(C)15 μM マガイニン 2

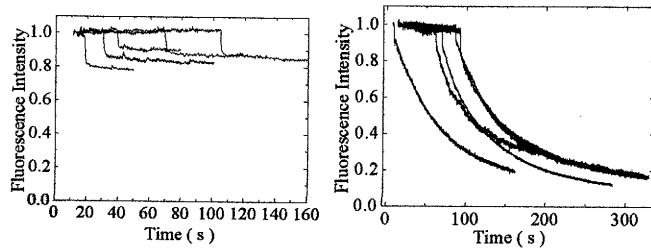


図 2.3 マガイニン 2 が誘起する FITC-BSA や AF-SBTI の GU からの漏れ
 15 μ M マガイニン 2 を 25 $^{\circ}$ C で添加したときの蛍光強度の時間変化
 (A)FITC-BSA、(B)AF-SBTI

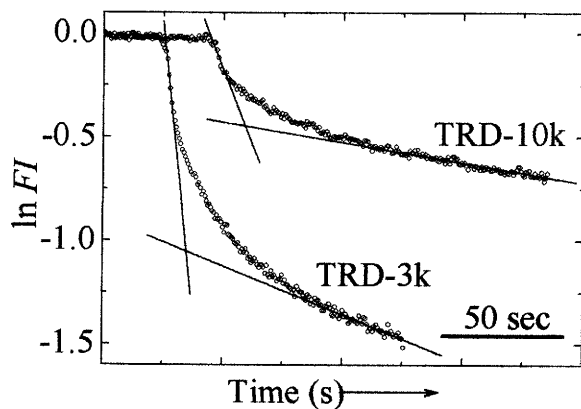


図 2.4 マガイニン 2 により誘起される GUV の蛍光強度の対数の時間変化
 TRD-3k と TRD-10k を含む GUV に $4 \mu\text{M}$ マガイニン 2 を添加したときその蛍光強度を規格化したものの対数($\ln FI$)の時間変化
 それぞれのグラフは初期状態と定常状態の 2 つの直線で近似される

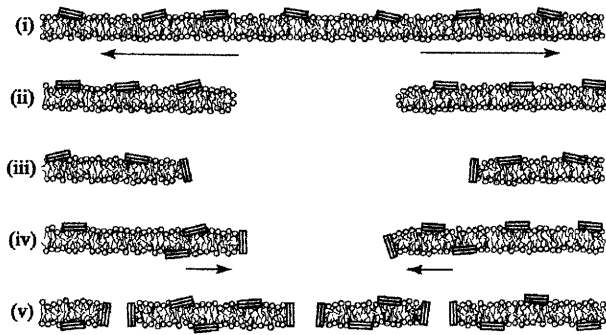


図 2.5

ポア形成のメカニズムの仮説

- (i) マガイニン2が外側単分子膜に結合
内側単分子膜が矢印方向に引っぱられる
- (ii) 熱揺らぎによるポア形成
- (iii) 脂質分子が拡散
- (iv) マガイニン2が内側単分子膜に入ることにより矢印方向に引かれる
- (v) 定常状態のポア形成

表 2.1 初期状態のポアにおける漏れの速度定数、ポアの有効面積、半径
(A)

Fluorescent Probes	the rate constants of the leakage: $k_{\text{leak}}^{\text{initial}}$ (s^{-1})		
R_{SE} (nm)	the effective cross-sectional area of the pores: S_p (nm^2)		
	the number of GUVs examined: n		
	the radius of the pore: r_{lp} (nm)		
	4 μM magainin 2	7 μM magainin 2	15 μM magainin 2
Calcein 0.74	$(3.6 \pm 1.0) \times 10^{-1}$ $(1.9 \pm 0.4) \times 10^3$ 7 24 ± 2	N.D.	N.D.
TRD-3k 1.4	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-1}$ $(1.0 \pm 0.1) \times 10^3$ 9 18 ± 1	$(1.9 \pm 0.1) \times 10^{-1}$ $(2.1 \pm 0.1) \times 10^3$ 29 26 ± 1	$(7.2 \pm 0.5) \times 10^{-1}$ $(6.6 \pm 0.5) \times 10^3$ 12 46 ± 2
TRD-10k 2.7	$(5.5 \pm 0.5) \times 10^{-2}$ $(1.2 \pm 0.1) \times 10^3$ 11 20 ± 1	$(8.2 \pm 0.8) \times 10^{-2}$ $(2.0 \pm 0.1) \times 10^3$ 12 25 ± 1	$(2.4 \pm 0.3) \times 10^{-1}$ $(4.9 \pm 0.7) \times 10^3$ 12 40 ± 3
AF-SBTI 2.8	$(3.6 \pm 0.7) \times 10^{-2}$ $(8 \pm 2) \times 10^2$ 6 16 ± 3	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-1}$ $(2.2 \pm 0.3) \times 10^3$ 14 26 ± 2	$(2.5 \pm 0.2) \times 10^{-1}$ $(4.7 \pm 0.4) \times 10^3$ 17 39 ± 2
TRD-40k 5.0	N.D.	$(4.0 \pm 0.3) \times 10^{-2}$ $(1.8 \pm 0.3) \times 10^3$ 10 24 ± 2	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-1}$ $(4.6 \pm 0.4) \times 10^3$ 17 38 ± 2
FITC-BSA 3.6	N.D.	$(4.8 \pm 0.3) \times 10^{-2}$ $(1.3 \pm 0.1) \times 10^3$ 9 20 ± 1	$(1.9 \pm 0.2) \times 10^{-1}$ $(6 \pm 1) \times 10^3$ 7 44 ± 4

(B) 定常状態のポアにおける漏れの数値定数、ポアの有効面積

Fluorescent Probes D ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)	the rate constants of the leakage: $k_{\text{leak}}^{\text{steady}}$ (s^{-1}) the effective cross-sectional area of the pores: S_p (nm^2) the number of GUVs examined: n		
	4 μM magainin 2	7 μM magainin 2	15 μM magainin 2
Calcein 3.3×10^{-10}	$(5.6 \pm 2.1) \times 10^{-2}$ $(3.3 \pm 1.2) \times 10^2$ 7	N.D.	N.D.
TRD-3k 1.7×10^{-10}	$(4.5 \pm 0.4) \times 10^{-3}$ $(3.8 \pm 0.5) \times 10^1$ 9	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^{-2}$ $(1.1 \pm 0.1) \times 10^2$ 28	$(2.0 \pm 0.6) \times 10^{-2}$ $(1.9 \pm 0.5) \times 10^2$ 12
TRD-10k 9.1×10^{-11}	$(2.2 \pm 0.5) \times 10^{-3}$ $(5 \pm 1) \times 10^1$ 11	$(3.3 \pm 0.4) \times 10^{-3}$ $(7.7 \pm 0.7) \times 10^1$ 12	$(7.6 \pm 0.9) \times 10^{-3}$ $(1.7 \pm 0.3) \times 10^2$ 12
AF-SBTI 8.8×10^{-11}	No leakage 6	No leakage 12	$(2.6 \pm 0.4) \times 10^{-3}$ $(6 \pm 1) \times 10^1$ 16
TRD-40k 4.9×10^{-11}	N.D.	No leakage 10	No leakage 17
FITC-BSA 6.8×10^{-11}	N.D.	No leakage 9	No leakage 7

3.1 はじめに

トランスポーター 10 (Tp10)はハチ由来のマストパランとニューロペプチドのガラニンをリジンによりつなげ N 末側のアミノ酸を 6 個削った 21 残基のペプチドである(Smoomets *etal.*, 2000)。マストパランは単独で、膜透過性能をもつ (Yandek *et al.*, 2009)。また、ガラニンはシナプスで、神経伝達物質として放出される。そして、脊髄の亢進性を抑制する。Tp10 は、ガラニン受容体に作用にしないことから脂質膜に直接作用することが考えられている。Tp10 は膜透過性ペプチドである。細胞に、添加したとき、内側へ移行することが報告されているので、膜透過ペプチドである(Pooga *et al.*, 2000; El-Andaloussi *et al.*, 2005)。Tp10 により、細胞の外から内へ透過し物質を輸送する事が期待できる。

これまでの Tp10 の実験では LUV 懸濁法が主だった。小さな蛍光プローブを含む LUV と Tp10 を相互作用させると時間とともに蛍光プローブはゆっくりと LUV の外に漏れた。また、LUV に蛍光物質 ANTS と消光剤 DPX を入れ、それぞれの漏れ方の違いによって生じる蛍光強度時間変化も調べられている(Yandek *et al.*, 2007)。その結果リポソームからの蛍光物質の漏れは急激に起きるものでなく、徐々におきるものであると推測され、ペプチドの膜透過性のフリップフロップ様モデルが提起された。

本章では、Tp10 が誘起する蛍光プローブの膜透過の素過程やメカニズムを解明するために、Tp10 と脂質膜の相互作用を単一-GUV法でしらべた。特に Tp10 が誘起するカルセインのもれや GUV の構造変化を単一-GUV法により研究し、Tp10 が誘起する脂質膜のポア形成の特性を研究した。

3.2 試薬と実験方法

3.2.1 試薬

DOPC と、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン-N-ポリエチレングリコール 2000 (PEG2K-DOPE)をアバンチ社より、ビオチン-X-ジヘキサノイルホスファチジルエタノールアミン(biotin-X-DHPE)をインヴィトロゲン社より、HEPES、と EDTA をドージンドーより、牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) は和光純薬工業 (株) より購入した。

3.2.2 ペプチド合成と精製

Tp10 は以下のような配列をもっている。AGYLLGKINLKALAALAKKILamide. FastMoc

法によりペプチドシンセサイザー433A(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)で合成した。Tp10の精製を行なうために、粗精製物のTp10をミリQで完全に溶かし、HPLCを用いて精製した。HPLCに用いるSol.Aは専用のポリ容器に1LのH₂Oを入れ1mLのTFAを加え作製した。Sol.Bは専用のポリ容器に900mlのAcCN(アセトニトリル)を入れ100mLのミリQと1mLのTFAを加えて作製した。カラムは精製用カラムCOSMOSIL 5C18-AR 10×250mmを用いて精製した。Tp10のペプチド結合は214nmの波長を吸収するので、重水素ランプの波長を214nmで固定した。粗精製物Tp10を上記プログラムでHPLC内に流し、一番大きなピークが現れたところの先端だけを集め、アセトニトリル溶液に溶けた精製されたTp10が得られた。またこのときにピークの根元付近のショルダーまで集めないように注意した。精製されたTp10溶液は液体窒素に10分程度つけ完全に冷凍させ、凍結乾燥を行った。-30℃で保存をした。

精製されたペプチドはイオンスプレー質量分析器(API 150EX, PE SCIEX, PE Applied Biosystems, Foster City, CA)で分析された。Tp10の測定値は2181±1であった。化学組成と同じ分子量が得られた。

ペプチドの濃度決定は吸光度計をもちいた。280nmでのTp10のモル吸光度を1280 (cm⁻¹M⁻¹)として計算をした。

3.2.3 GUVの作製と精製

GUVは脂質の薄い層を水溶液中で静かに水和(プレハイドレーション)させることにより得る。クロロホルムに溶解した1mMのリン脂質の混合溶液(97.5mol% DOPC/1.5mol%PEG2k-DOPE/1mol%biotin-X-DHPE)をガラス製のサンプル管に200μL加え、室温で窒素ガスを用いて乾燥し、薄い混合膜の脂質フィルムを作製した。さらに回転式真空ポンプにつないである真空デシケーター中に10時間以上おき、クロロホルムを完全に乾燥した。乾燥した脂質膜フィルムに10μLの水をのせ、50℃で10分間のプレハイドレーションをおこなった。その後、1mLの0.1Mスクロースと1mMカルセインを含む緩衝液A(10mM HEPES (pH7.5)、100mM NaCl、1mM EGTA)をサンプル管に加え37℃で2時間静置した。

まず、上記の方法で作製したGUV溶液中に必ず含まれるMLVを取り除くために、GUV溶液を遠心分離(12000rpm、15分間、20℃)した。水溶性の蛍光プローブであるカルセインを内包したGUVは12μmのフィルターを用いて精製をした。

3.2.4 単一GUV法の実験方法

おもに2-2-3を参照のこと。

添加させるために使用する Tp10 緩衝液は、Tp10 が 280 nm の波長の光を吸収することを利用して、Tp10 濃度を決定した。Tp10 は 0.1M グルコースを含む緩衝液 A 中に溶解させマイクロピペットで GUV に添加した。GUV とマイクロピペットの距離は 70 μm とした。実験には 10-20 個の GUV を用い、独立の実験を 3 回以上行った。

3.2.5 LUV の作製と LUV を用いた漏れの実験

LUV は 10 mM DOPC を 100 μL サンプル管にいれ、窒素ガス下で乾燥したのち、真空デシケーターで一晩乾燥した。乾燥した脂質に 40 mM カルセイン水溶液を加え、激しく震動させた。フリーズソーイングをくり返し、200 nm の孔径のポアフィルターに 30 回通した。そののち溶液は G-75 カラムに緩衝液 A バッファーとともに加え LUV の画分を採取した。

各濃度の Tp10 を添加し、攪拌、蛍光を蛍光分光光度計を用いて測定した。最初 LUV 内部のカルセイン濃度は高いので自己消光により、蛍光強度は小さいが、LUV 内のカルセインが LUV 外部にもれると蛍光強度が増大する。100%のカルセインが LUV の外に漏れたとき、蛍光強度は最大となるが、それは LUV 懸濁液に Triton-X100 が最終的に 0.6%(v/v)となるように加えることによって実現した。漏れの割合は以下のように計算した。

$$P_{\text{leakage}}(\%) = \frac{F(t) - F_0(t)}{F_{\text{Triton-X100}}(t) - F_0(t)} \times 100 \quad (3-1)$$

ここで $P_{\text{leakage}}(\%)$ とは漏れの割合、 $F(t)$ は Tp10 を添加したときの時刻 t における蛍光強度、 $F_0(t)$ は LUV 懸濁液に緩衝液 A のみを加えたときの蛍光強度、 $F_{\text{Triton-X100}}(t)$ は Triton-X100 を LUV 懸濁液に加えたときの蛍光強度である。

3.3 結果

3.3.1 Tp10 が誘起する LUV からのカルセインの漏れ

カルセインを含む LUV 懸濁液に種々の濃度の Tp10 を加えたときの漏れの割合を図 3.1(A) に示した。0.1 μM 以上の濃度の Tp10 との相互作用では漏れの割合は時間とともに増大し、10 分後にはほぼ一定となった。10 分後の漏れの割合は Tp10 濃度とともに増加した。0.4 μM 、1.2 μM Tp10 では開始後 15 分以内に 100% 近く漏れをしめた。0.4 μM Tp10 では約 200 秒で約 80% が漏れた。

3.3.2 Tp10 が誘起する 1 個の GUV からのカルセインの漏れ

マイクロピペットを用いて 1.2 μM Tp10 を 1 mM 蛍光物質カルセインをふくむ 1 個の DOPC-GUV の近傍に添加し、その間の GUV の構造と蛍光強度を蛍光顕微鏡で観察した。温度は 25 $^{\circ}\text{C}$ で行った。Tp10 の添加前の位相差像では、GUV の内(0.1 M スクロース)と外(0.1 M グルコース)の位相の差によって、強いコントラストがあった(図 3.2 (A))。このとき同じ GUV の蛍光顕微鏡像ではカルセインにより、GUV 内部の蛍光強度は高かった(図 3.2(A)(2))。1.2 μM Tp10 添加後 140 秒あたりまで蛍光強度に変化はなかったが、その後に蛍光強度が急激に減少した。急激な減少を始めてから 30 秒後の蛍光強度は減少前の 1 割程度になった。このときの GUV の位相差像(図 3.1 (A)(3))は GUV の形はそのまま、コントラストのみがなくなった。これは GUV が壊れることなく、ポアを形成し、GUV 内のスクロースとカルセインが流出したためと考えられる。従って蛍光強度が急激に減少し始めた時刻が Tp10 が脂質膜にポアを形成した時刻と考えられる。同様の条件で多くの 1 個の GUV を用いて実験を行った。ほかの GUV でも同様の結果がえられた(図 3.2 (C))。ただし漏れがおこりはじめる間は同じでなく、ランダムであった。つまり、Tp10 のポア形成はランダムに起こることがわかる。

多くの GUV からの漏れを評価する場合、カルセインが漏れた GUV の割合を議論する事が重要である。よって、実験した GUV のうち、Tp10 を添加し始めてから t 秒後においてすめでの調べた GUV の中で漏れた GUV の確率を R_s と定義する。カルセインがもれていない GUV の割合を R_{intact} とすると、 $R_{\text{intact}} = 1 - R_s$ である。図 3.2 (D)種々の濃度の Tp10 が存在するときの R_s の時間変化を表わしている。 R_s は時間とともに増大し、また Tp10 濃度の増大とともに R_s の増加する速度はおおきくなっていく。1.2 μM Tp10 存在下では 250 秒で 100%の GUV がもれた。図 3.2 (E)は Tp10 と相互作用して 5.5 分における R_s と Tp10 濃度の関係をあらわしている。濃度上昇とともに、 R_s は増大した。

また、一方で GUV に Tp10 を添加したとき一過性のもれが多段階でおこる漏れも見られた。図 3.3(A) は 150 秒程度まで漏れはなく、その後 30 秒の間に 2 回小さな漏れが起きている。図 3.3(B)は図 3.2(B)と同じような一度に大きく漏れるという形式を示した。

3.3.5 Tp10 との相互作用による GUV の位相差像の変化

GUV に 0.8 μM Tp10 を添加すると、GUV の大きさは減少した(図 3-4(A)(B))。(A)では 125 秒間後に、(B)では 33 秒後にスクロースがもれはじめ、その後 GUV の大きさが数分かき小さくなった。同様に GUV に 0.4 μM Tp10 を添加すると GUV の大きさは変化した(図 3-5)。289 秒後にスクロースが漏れ始め、GUV の大きさは小さくなった。その後数分の後も 0.8 μM ほどの大きさの減少率は示さなかった。

GUV が小さくなるのは多段階で起こる場合や、あまり変化しない場合、一度スクロースが

漏れた後、急激に小さくなる場合があった。

3.3.6 Tp10 が誘起する GUV の変形

Tp10 と脂質膜の相互作用による GUV の変形を調べた。まず、楕円体の GUV と Tp10 の相互作用を調べた(図 3.6(A))。添加開始後、53 秒で小さな球形 GUV と大きな球形 GUV が細チューブで結合した形に変化した。また、添加を止めて、しばらくすると、もとの楕円形に戻った。図 A-2 ではチューブ型の GUV に Tp10 を添加した。添加開始後 203 秒あたりで形が変形し始め、240 秒で一連真珠形に変化した。楕円型と同様に、添加を止めて、しばらくすると、もとのチューブ型に戻った。11 個の楕円体の GUV で実験したところ、10 個の GUV で同様の変形がおこった。

マイクロピペットにより Tp10 を添加すると、GUV の形はチューブが一連真珠形に、楕円体が細いチューブで繋がれた二つの球体に変化した。また Tp10 の添加をやめると元の形に戻った。つまり、この変化は可逆性であった。同様の条件で緩衝液のみを楕円体の GUV と相互作用させたときは変形はおきなかった。(n = 5)

3.4 考察

3.4.1 Tp10 が誘起するカルセインの漏れ

Tp10 をカルセイン入り GUV に添加したとき、一過性の大きな漏れや短い時間でのもれをくりかえしながら最後に大きな漏れをしめす形式などが確認された。GUV で漏れが起り始めてから 30-60 秒で完全に漏れる。したがって、律速段階は Tp10 が膜中でポア形成をする段階と考えられる。したがって、LUV 懸濁液中でもれが時間とともに増大するのはもれた LUV(もれた LUV の割合)が時間とともに増大するためと考えられる。Tp10 の濃度増大により LUV 懸濁液で漏れの速度が増大する。これは GUV で Tp10 の濃度増大により、もれた GUV の割合が早く高まることと一致している。

3.4.2 Tp10 が誘起するポア形成の速度定数

図 3.7 は 1.2 μM Tp10 存在下での R_{intact} の時間経過を示した図である。時間とともに、 R_{intact} は減少し、300 秒では漏れていない GUV の割合は 0 になった。

Tp10 が膜に結合した状態(B 状態)と、ポアを形成した状態(P 状態)の 2 状態があると仮定する。B 状態から P 状態への転移が 2 状態転移と仮定すると、B 状態の割合は指数関数的に減衰する。B 状態の割合は実験的に求まる P_{intact} に等しい。したがって P_{intact} は以下の式で表される。

$$P_{\text{intact}}(t) = \exp(-k_p(t - t_i)) \quad (3.2)$$

k_p は B 状態から P 状態への転移が 2 状態転移 (つまりいいかえればポア形成) の速度定数で、 t_i はパラメーターである。同様の実験を何回か行ってそれぞれの実験で k_p をもとめ、その平均をとると 1.2 μM Tp10 の時は、 $k_p = (8 \pm 3) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($n = 3$) となった。表 3.1 は k_p の Tp10 濃度依存性をあらわす。Tp10 濃度の増加とともに k_p は大きくなる。

3.4.3 Tp10 が誘起するカルセインの漏れの速度

Tp10 が誘起する漏れ方はいろいろな形式を示した。一つは小さな一過性のもれを繰り返す漏れの形式である。2 つ目は一過性の大きなもれの形式である。ここに GUV 内の蛍光強度 $F(t)$ を考える。2 番目の漏れ方において GUV はある時刻 t_{eq} からポアを形成すると、 $F(t)$ のその値は指数関数で近似できる。以下のような数式を立てた。

$$F(t) = \exp(-k_{\text{leak}}(t - t_{\text{eq}})) \quad (3.3)$$

1.2 μM Tp10 が誘起するカルセインの漏れを図 3.7 に表した。蛍光強度の時間変化を(3.3)式によりフィッティングした結果、 $k_{\text{leak}} = 0.053 \text{ s}^{-1}$ が求まった。また、Tp10 の濃度依存性を表 3.2 にまとめた。 k_{leak} は Tp10 濃度にあまり依存しなかった。GUV 内の蛍光強度では最初の GUV 蛍光強度の 5%程度が数回漏れる形式と一過性の大きな漏れの形式が見られた。

3.4.4 Tp10 が誘起する GUV の変形

Tp10 を GUV にマイクロピペットを用いて添加した。GUV の形はチューブが一連真珠形に、楕円体が細いチューブで繋がれた二つの球体に変化した。この変化は可逆性であった。トランスポーター 10 を添加すると、GUV の近傍にトランスポーター 10 が分布され、GUV の外側の脂質膜に結合する。添加をやめると、GUV からトランスポーター 10 が解離し、元の GUV 膜に戻る (図 3-5-2)。GUV の変形は ADE モデルにより、説明される。チューブが一連真珠形に、楕円体が細いチューブで繋がれた二つの球体に変化するのには GUV の体積が変

ならず、外側の単分子膜の表面積が増大した場合である。これは GUV の疎水性部位に疎水性のアミノ酸をもつ Tp10 が入り込み、外側の表面積が増大したことが原因であると考えられる。

3.4.5 Tp10 が誘起するカルセインの漏れのメカニズム

位相差顕微鏡で GUV に Tp10 を添加したとき大きさの変化が多段階で起こり、結局小さな脂質の塊になる場合や、一度におおきく変化して小さくなってしまう場合、またあまり変化しない場合があった。一番目はカルセインの漏れが短い時間でのもれをくりかえす場合に対応していると考えられる。二番目と三番目はカルセインが一過性の大きな漏れを起こしている場合に対応していると考えられる。

以上のことを踏まえ、Tp10 が誘起するポア形成を考える。アルメイダの研究グループによれば、ペプチドは徐々に入り込み、その際内側の分子をもらすフリップフロップ 様モデルを提起している (Yandek et al., 2007)。しかし、Tp10 は正電荷を 4 個もつので誘電率の低い膜の疎水性コアを通過するのは困難である。

ペプチドの疎水性基がリポソームの疎水性部位に近づき、外側単分子膜の表面圧を増大させる。その結果不安定となり、ペプチドがリポソーム内部に入り込むと考えられる。フリップフロップではなく、一度ポアが開きそののち、かさなりあって、小さくなると考えられる。

Tp10はその配列にマストパランを含んでいる。マストパランとその類似体は水中でGUVに添加すると、GUVが重層構造となり、小さくなるということが最近発表された。彼らは脂質膜にポアがあいた後、脂質膜がペプチドを介し重なり合い、重層構造をとると解釈している。

3.5 結論

今回単一 GUV 法を使用した。Tp10 添加により、ポアが形成されたが、その速度定数やもれの速度定数を求めることができた。GUV の形は外側単分子膜の増大方向に変形する。ポア形成の後リポソームが小さくなることも新たにわかった。また、ポアの形成のモデルも示した。Tp10 が作用するヒト細胞はコレステロールを膜に含んでいる。今後はコレステロールを含んだ膜と Tp10 の相互作用を研究する予定である。

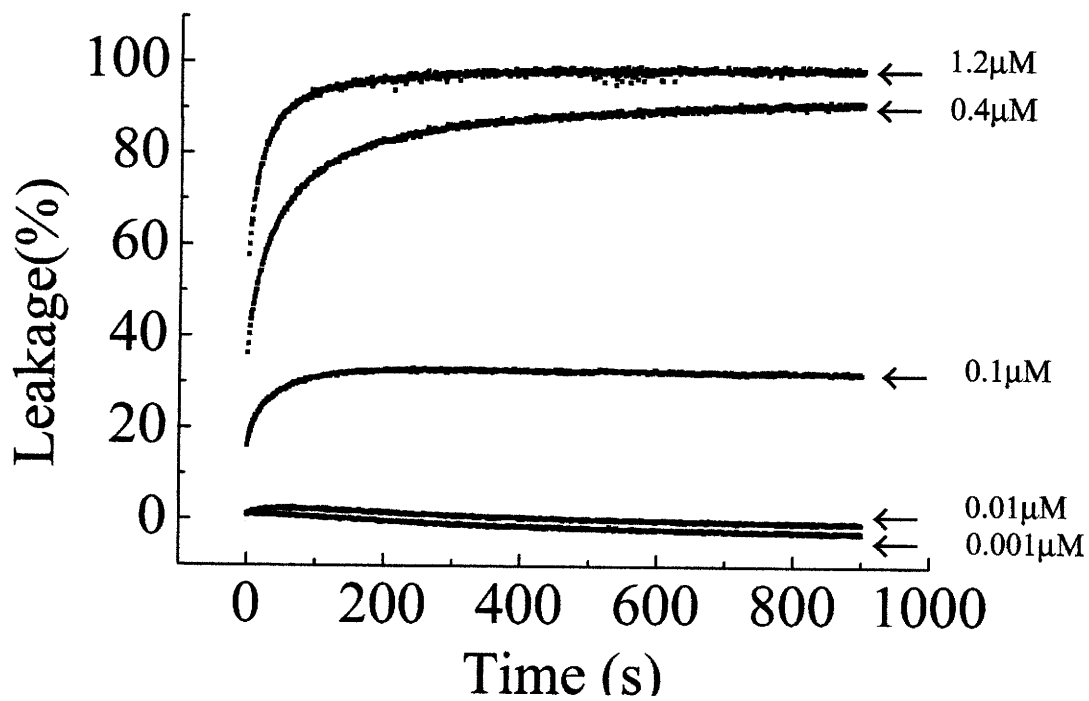


図 3.1 Tp10 による LUV からのカルセインの漏れ

グラフは上から Tp10 の濃度が 1.2 μM 、0.4 μM 、0.1 μM 、0.01 μM 、0.001 μM になっている。
 Trito-X100 が 0.6% となるように入れたものを使用し、規格化した。

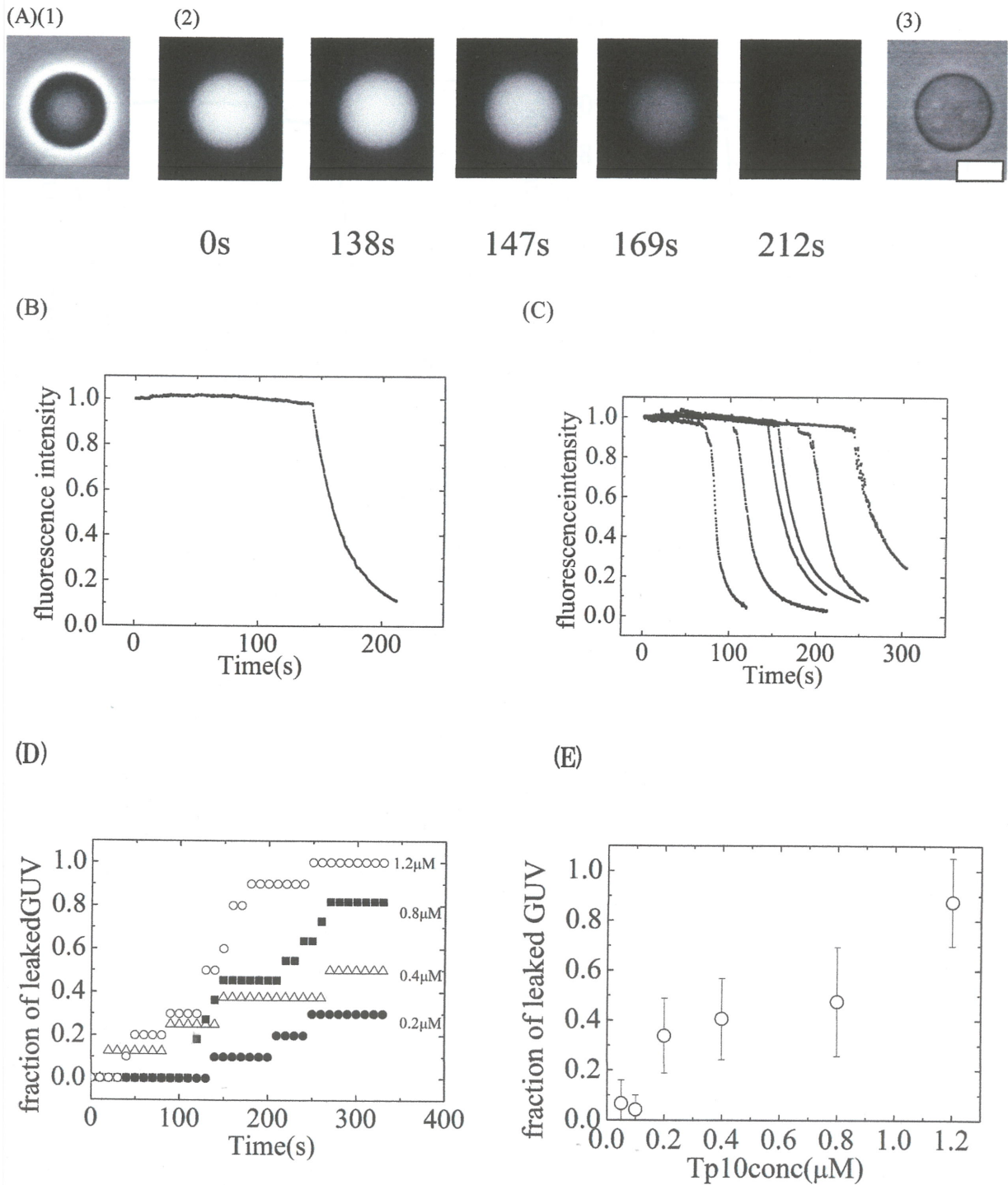


図 3-2 Tp10 によるカルセインの漏れ

A) 1.2 μM Tp10 を GUV に添加したときの蛍光顕微鏡像と位相差像 バーの大きさは 10 μm

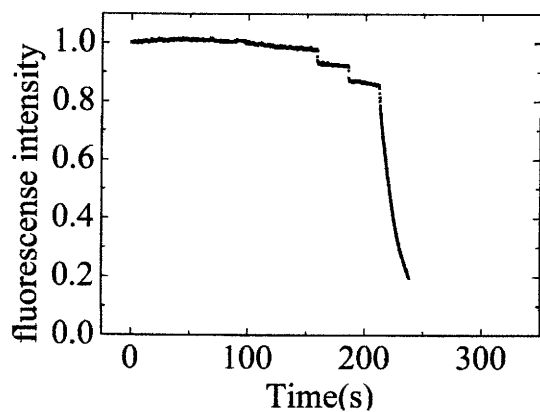
B) (A)内の蛍光強度を規格化したもの

C) おおくの GUV で実験したもの

D) もれた GUV の割合の時間変化

E) 5.5 分でのもれた GUV の割合と Tp10 の濃度

(A)



(B)

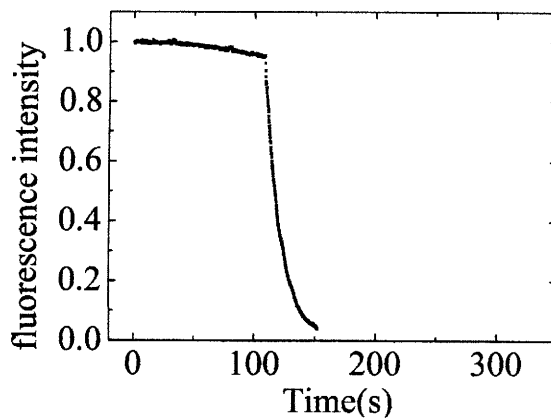


図 3-3 0.8 μ M Tp10 を GUV に添加したときの GUV 内蛍光強度の時間変化

(A)は 150 秒から 200 秒にかけて 2 回蛍光強度が 5%程度減少した後、大きな漏れを引き起こしている。

(B)は 100 秒において一過性のおおきな蛍光強度の減少を示した。

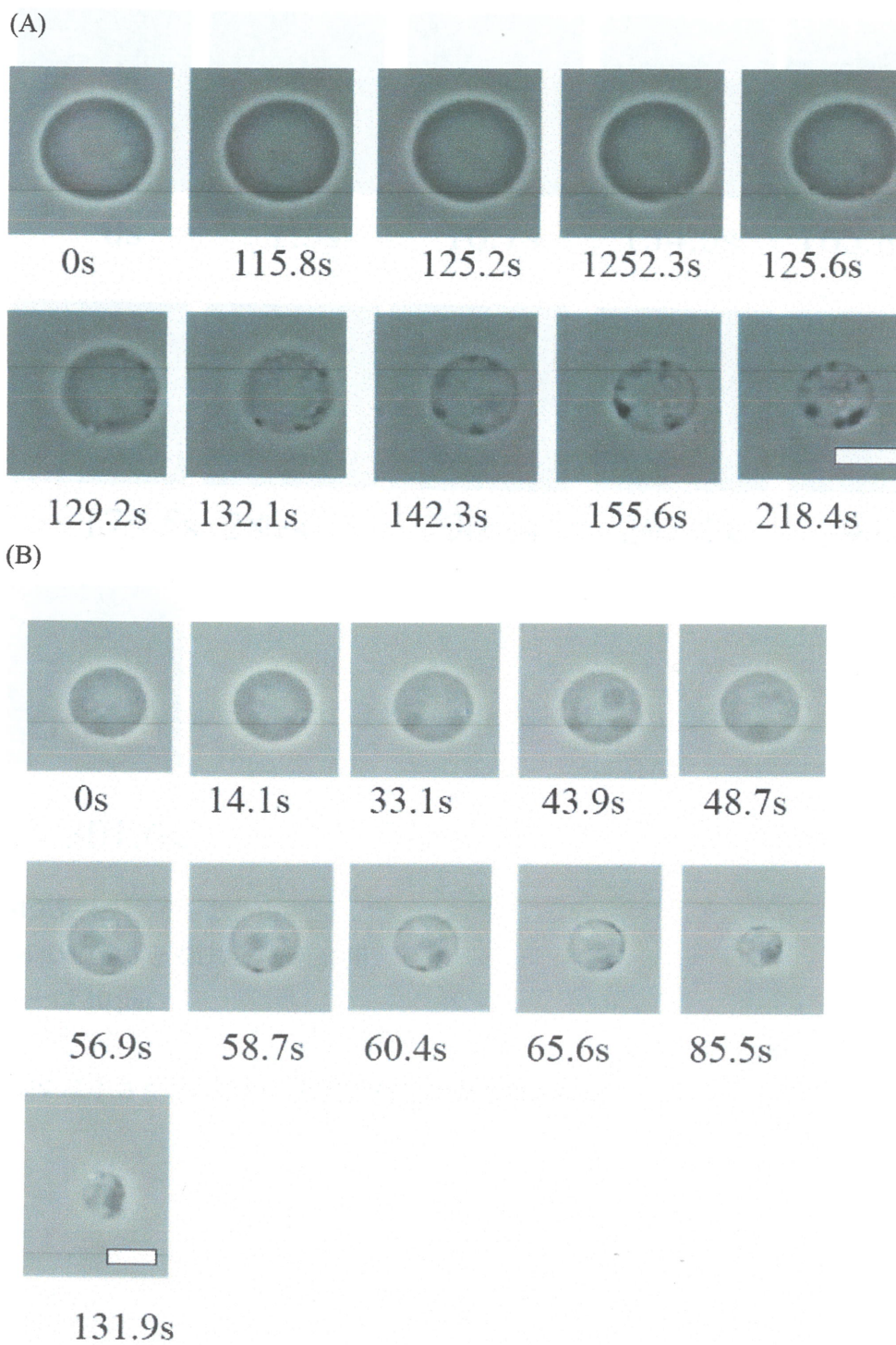


図 3-4

0.8 μM Tp10 と GUV の相互作用。位相差顕微鏡像 バーは 10 μm

(A)(B)スクロースが漏れた後、両方とも最終的にはちいさなりポソームとなっている

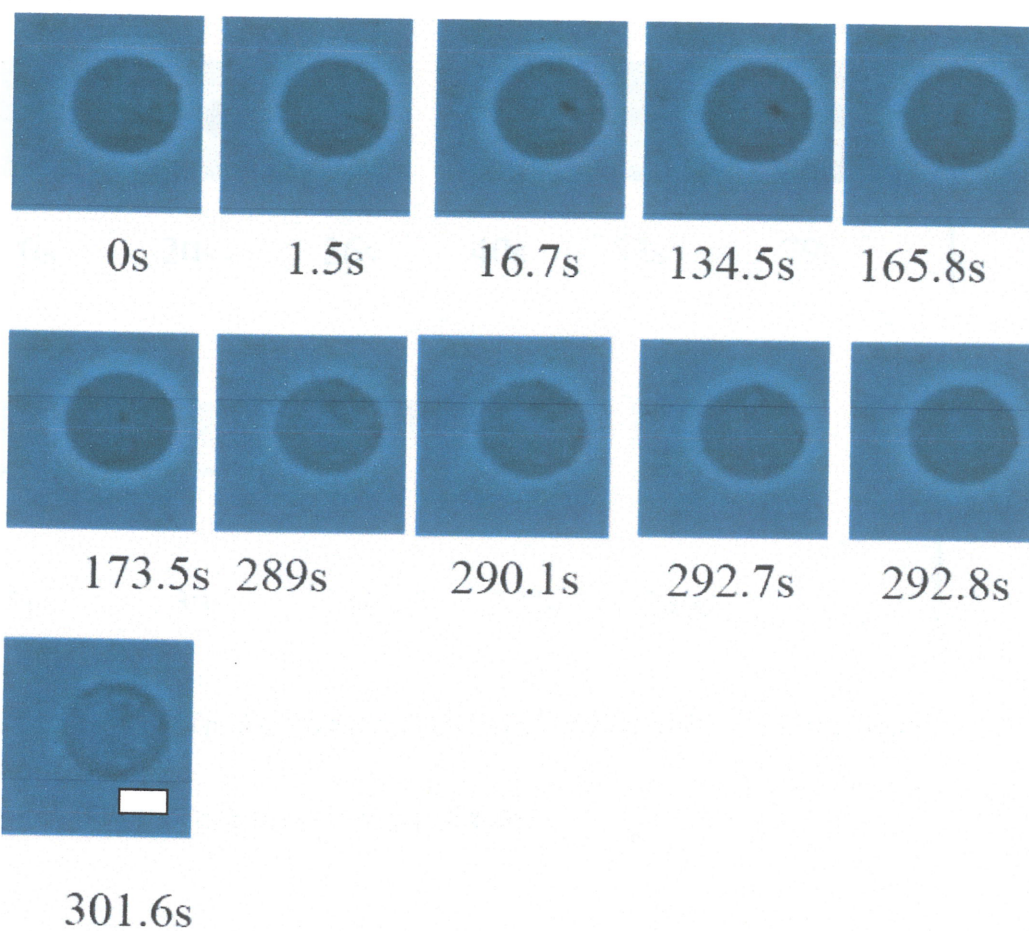


図 3.5
 0.4 μM Tp10 と GUV の相互作用
 バーは 10 μm

GUV は小さくなったが、脂質の塊にはならなかった

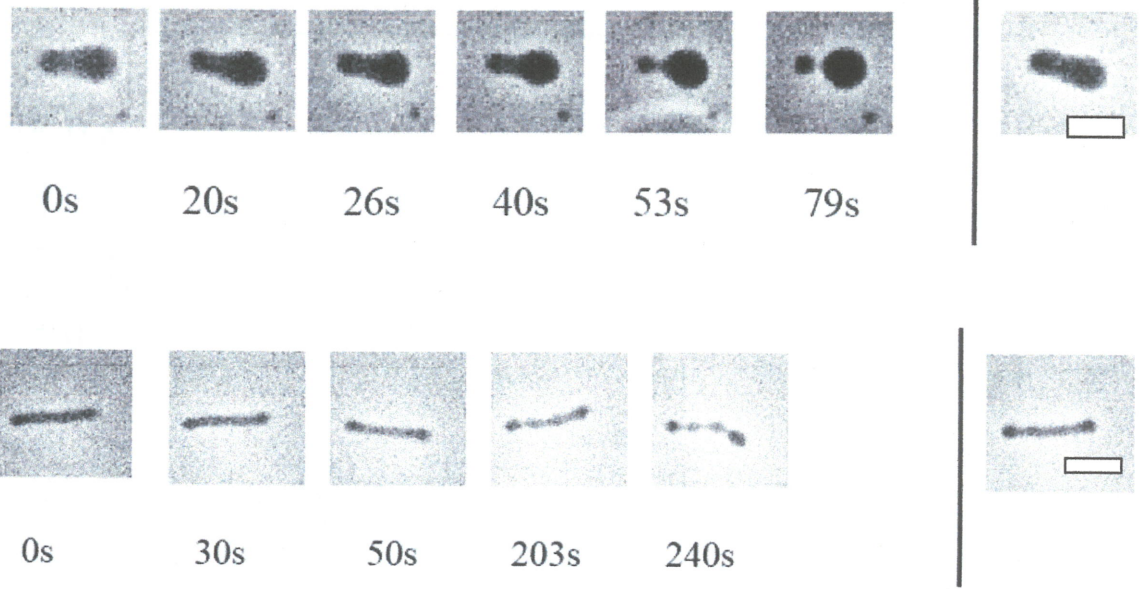


図 3.6
 GUVに $0.8 \mu\text{M}$ Tp10 を添加したときの GUV の形の変化 バーは $10 \mu\text{m}$
 位相差像
 うえは楕円形、下はチューブ型からの変形

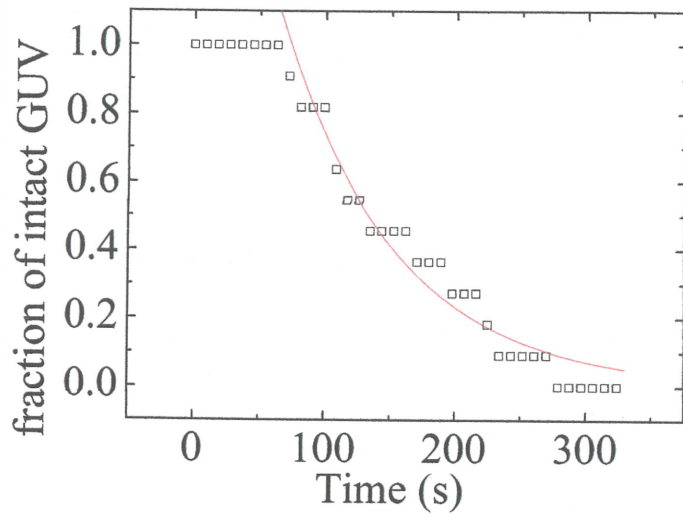


図 3.7 Tp10 添加したときの漏れていない GUV の割合

.2 μM Tp10 を添加したときの漏れていない GUV の割合と時間の関係を示した図である。50 秒で最初に GUV が漏れ始める。300 秒では漏れていない GUV の割合は 0 になる。 k_p は 0.012 s^{-1} である。

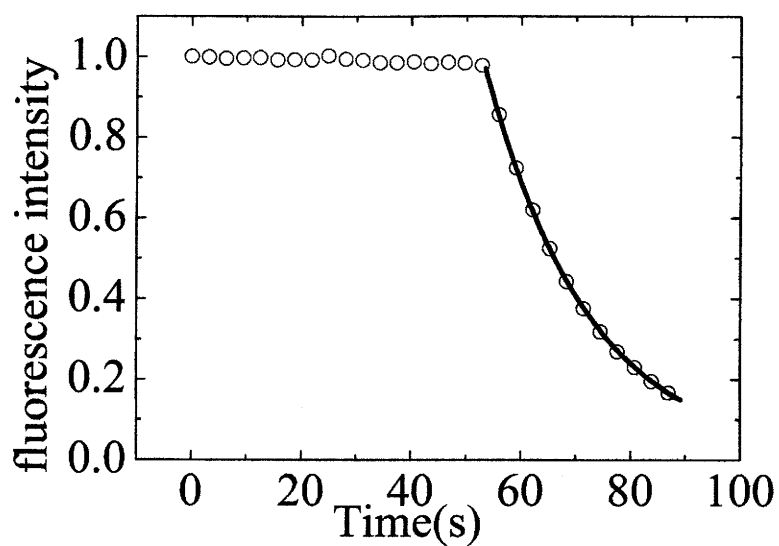


図 3.8

1.2 μM Tp10 を添加したときの GUV の蛍光強度の時間変化

Tp10 を添加すると、カルセインが漏れ蛍光強度変化が起こった。ある GUV においてその値の変化を近似した。

Tp10 濃度	k_p (s ⁻¹)	実験回数
1.2 μM	$(8\pm3)\times 10^{-3}$	n=3
0.8 μM	$(13\pm6)\times 10^{-3}$	n=2
0.4 μM	2.3×10^{-3}	n=1
0.2 μM	n.d	

表 3.1

種々の Tp10 濃度におけるポア形成の速度定数 k_p の平均値

Trp10濃度	$k_{\text{leak}}(\text{s}^{-1})$	n
1.2 μM	0.07 ± 0.02	25
0.8 μM	0.05 ± 0.01	17
0.4 μM	0.056 ± 0.007	11

表 3.2

各濃度における k_{leak} の値

GUVからのカルセインの漏れの速度定数

第4章 結論

マガイニン2とTp10のポア形成について単一GUV法を用いて研究した。まずマガイニン2では種々の大きさの蛍光プローブをGUVに入れて、マガイニン2との相互作用をしらべた。7 μM マガイニン2とTRD-10kを含む50% DOPG/DOPC-GUVでは、蛍光強度は数秒間急速に減少後、ゆっくりと減少した。TRD-10kがGUVからの漏れはじめてから、100秒の間に、60%が漏れた。多くのGUVに対して実験したが、結果は同様で、二相性の蛍光強度減少を示した。一方よりおおきなFITC-BSAを含むGUVと15 μM マガイニン2の相互作用では、蛍光強度は短く5秒間程度の一過性のわずかな減少しかしめさなかった。それ以降はまったく減少しなかった。

また、種々の蛍光プローブの漏れの数値より、ポアの有効面積を求めた。ポアは大きな初期状態から定常状態に変化することが考えられる。

Tp10はGUVにポアをあげ、GUVを小さくすることがわかった。また、GUVの外側単分子膜の面積を増大させることも、GUVの変形の実験より考えられる。

二つのペプチドの共通点は配列である。一次配列ではリジンを多く持ち、三次配列では膜中で α -ヘリックスをとる。もともと抗菌性ペプチドのリジンを含むグループと抗菌性ペプチドは類似している(Fatemeh et al.2011)。異なるのは目的の細胞である。マガイニン2は菌などの負電荷を帯びた脂質膜を対象とするのに対し、Tp10はヒトを対象とし、中性脂質に結合する。マガイニン2はヒトには攻撃しないが、それは負電荷を外側単分子膜にもたないことと、コレステロールを含んでいることが原因といわれている。2つのペプチドの類似点と相異点を表5.1にまとめた。

コレステロールはヒトなどの脂質膜にみられ、膜の弾性率を大きくする。コレステロールを含む膜とトランスポータン10との相互作用は今後の課題である。

	マガイニン2	Tp10
1)ターゲット	細菌の外側単分子膜 (負電荷有り)	真核生物の細胞膜(負電荷の 脂質なし、コレステロールあ り)
2)ポア形成	有り	有り(DOPC)
3)ポア形成のための膜の条件	負電荷密度大(例 DOPG/DOPC)	負電荷は必要なし(例DOPC)
4)ポア形成後のGUVの形	ほぼ同じ大きさと形	10%程度大きさが減少する場 合あり。局所的に密度が高い 膜有り
5)ポア形成の速度定数	マガイニン2濃度とともに 増大	Tp10濃度とともに増大
6)カルセインの膜透過	一段階で漏れる。濃度 が低いときは二相性	一段階のときと多段階のとき がある。
7)膜透過の速度定数	マガイニン2濃度とともに k_{leak} 増大	Tp10濃度にかかわらず k_{leak} は一定
8)膜の面積変化	マガイニン2によりGUV の外側単分子膜の面積 増大	Tp10によりGUVの外側単分 子膜の面積増大

表 5.1

参考文献

- Ariyama ,H.; Tamba, Y.; Levadny, V.; Yamazaki, M. *Proc. IEEE International Symp. Micro-NanoMechatronics and Human Science*, **2009**, 208.
- Bárány-Wallje , E.; Gaur, J.; Lundberg , P.; Langel ,U.; Gräslund, A. *FEBS Lett.* **2007** , 581, 2389.
- Bechinger, B.; Zasloff, M.; Opella, S.J. *Protein Sci.* **1993** ,12, 2077.
- Bessale, R.; Kapitkovsky, A.; Gorea, A.; Shalit, I.; Fridkin, M. *FEBS Lett.* **1990**, 274,151.
- Boggs, J. M.; Euijung, J.; Polozov, I. V.; Epand, R. F.; Anantharamaiah, G M.; Blazyk, J.;Epand, R. M. *Biochim. Biophys. Acta.* **2001**, 1511, 28.
- Cabrera, M. P.; Alvares, D. S.; Leite ,N. B .; de Souza, B. M.; Palma ,M. S.; Riske, K. A.; Neto, J. R. *Langmuir.* **2011**, 27, 10805
- Diamond, G; Beckloffl, N.; Weinberg, A.; Kisich, K. O. *Curr .Pharm. Des.* **2009** , 15, 2377.
- El-Andaloussi, S.; Johansson, H.; Magnusdottir, A.; Järver, P.; Lundberg, P.; Langel, U. *J Control Release.* **2005** , 110, 189.
- Evans, E.; Heinrich, V. ; Ludwig, F.; Rawicz, W. *Biophys. J.* **2003**, 85, 2342.
- Goins, A. B.; Sanabria, H.; Waxham, M. N. *Biophys. J.* **2008**, 95, 5362.
- Gregory, S. M.; Pokorny, A.; Almeida, P. F. F. *Biophys. J.* **2009**, 96, 116.
- Gribbon, P.; Hardingham, T. E. *Biophys. J.* **1998**, 75, 1032.
- Hwang, P. M.; Vogel, H. J. *Biochem. Cell Biol.* **1998**, 76, 235.

- Karatekin, E.; Sandre, O.; Guitouni, H.; Borghi, N.; Puech, P. -H.; Brochard-Wyard, F. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 1734.
- Kawamoto, S.; Takasu, M.; Miyakawa, T.; Morikawa, R.; Oda, T.; Futaki, S.; Nagao, H. *J Chem Phys.* **2011**, *134*,
- Leontiadou, H.; Mark, A. E.; Marrink, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12156.
- Ludtke, S. J.; He, K.; Heller, K. H.; Harroun, T. A.; Yang, L.; Huang, H. W. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13723.
- Madani, F.; Lindberg, S.; Langel, U.; Futaki, S.; Gråslund, A. *J Biophys.* **2011**, *2011*, 1.
- Matsuzaki, K. *Biochim. Biophys. Acta.* **1998**, *1376*, 391.
- Matsuzaki, K.; Murase, K.; Fujii, N.; Miyajima, K. *Biochemistry* **1995**, *34*, 6521.
- Matsuzaki, K.; Sugishita, K.; Ishibe, N.; Ueha, M.; S. Nakata, S.; K. Miyajima, K.; Epanand, R. M. *Biochemistry* **1998**, *37*, 11856.
- Melo, M. N.; Ferre, R.; Castanho, M. A. R. B., *Nat. Rev. Bacteriol.* **2009**, *7*, 245.
- Needham, D.; Nunn, R. S. *Biophys. J.* **1990**, *58*, 997.
- Palma, S. J.; Riske, K. A.; Neto, J, R. *Langmuir*, **2011**, *27*, 10805.
- Pooga, M.; Hällbrink, M.; Zorko, M.; Langel, U. *FASEB J.* **1998**, *12*, 67.
- Pooga, M.; Kut, C.; Kihlmark, M.; Hällbrink, M.; Fernaeus, S.; Raid, R.; Land, T.; Hallberg, E.; Bartfai, T.; Langel, U. *FASEB J.* **2001**, *15*, 1451
- Qian, S.; Wang, W.; Yang, L.; Huang, H. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2008**, *105*, 17379.
- Salmon, E. D.; Saxton, W. M.; Leslie, R. J.; Karow, M. L.; McIntosh, J. R. *J. Cell Biol.* **1984**, *99*, 2157.
- Sandre, O.; Moreaux, L.; Brochard-Wyard, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1999**, *96*, 10591.
- Schultz, S. G. *Basic Principles of membrane transport*, Cambridge University Press: Cambridge, 1980.
- Skarks, R. C.; Watson, D. W. *Bacteriol Rev.* **1957**, *21*, 273.

Soomets, U.; Lindgren, M.; Gallet, X.; Hällbrink, M.; Elmquist, A.; Balaspiri, L.; Zorko, M.; Pooga, M.; Brasseur, R.; Langel, U. *Biochim Biophys Acta*. **2000**, *31*, 1467.

Tamba, Y.; Ohba, S.; Kubota, M.; Yoshioka, H.; Yoshioka, H.; Yamazaki, M. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 3176.

Tamba, Y.; Yamazaki, M. *Biochemistry* **2005**, *44*, 15823.

Tamba, Y.; Yamazaki, M. *J. Phys. Chem. B.* **2009**, *113*, 4846.

Thore'n, P. E.; Persson, D.; Lincoln, P.; Norde'n, B. *Biophysical Chemistry* **2005**, *114*, 169.

Venturoli, D.; Rippe, B. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **2005**, *288*, F605.

Wade, D.; Boman, A.; Wahlin, B.; Drain, C. M.; Andreu, D.; Boman, H. G.; Merrifield, R. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1990**, *87*, 4761.

Yamazaki, M. In *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes, Vol. 7*, A. Leitmannova A. L., Ed.; Elsevier/Academic Press: London. p. 121.

Yandek, L. E.; Pokorny, A.; Florén, A.; Knoelke, K.; Langel, U.; Almeida, P. F. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 2434

Yandek, L.E.; Pokorny, A.; Almeida, P. F. *Biochemistry*. **2009**, *4*, 7342

Yang, L. T.; Weiss, M.; Lehrer, R. I.; Huang, H. W. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 2002.

Yoshida, N.; Tamura, M.; Kinjo, M. *Single Mol.* **2000**, *1*, 279.

Zasloff, M. *Nature* **2002**, *415*, 389.

Zasloff, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1987**, *84*, 5449.

Zasloff, M.; B. Martin, B.; Chen, H.-C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1988**, *85*, 910.

岩室祥一, 比較内分泌, **2009**, *35*, 71.

吉谷卓也, 修士論文, 2008年2月