

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19540425

研究課題名 (和文) 各種顕微分光法による膜破壊性ペプチドと膜との相互作用機序の解明

研究課題名 (英文) Microscopic and spectroscopic study on interactions of membrane-lytic peptides with biomembranes.

研究代表者

大場 哲彦 (OHBA TETSUHIKO)

東北大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：10250664

研究成果の概要 (和文)：

自然界に存在する比較的短いポリペプチド (アミノ酸長で10～30程度) が、体内に侵入した細菌などを死滅させる機能を持ち、現在臨床で広く使われている抗生物質の代わりに使われる可能性が指摘されている。本研究では、そのような膜破壊性ペプチドの生体膜と相互作用メカニズムについて調べ、代表的な膜破壊性ペプチドであるメリチンと生体膜で構築される構造が、これまで考えられていたものとは大きく異なることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Naturally occurring polypeptides, which length of amino acid sequence is ranged from a ten to several tens, have abilities to corrupt biomembrane structure of bacteria and therefore are expected alternatives for antibiotics. We studied interactions of such membrane-lytic peptides with biomembranes by microscopic and spectroscopic methods and elucidated that the structure formed by melittin and DMPC is not ordinary vesicle structure proposed in the past study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：膜破壊性ペプチド、顕微分光、膜流動性イメージング、ミューラ行列顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

自然界には、脂質膜と相互作用して、外敵の膜を破壊する (孔の形成等も含む) ペプチドが、数多く報告されており、その数は、現在までに約800 に達している (<http://www.bbcm.univ.trieste.it/>)。膜破壊性ペプチドの共通の性質としては、次のようなことが挙げられる。

・比較的短い15～45 残基程度のペプチドで、

正電荷を持ったアルギニンやリシンが豊富である。

- ・2次構造 (α ヘリックスや β シート) を形成すると両親媒性になる。膜と相互作用した場合に、2次構造を形成する場合が多い。
- ・リボソームや細胞に作用させると、その内容物を外部に放出させる。これが、外敵を死滅させる最も重要な生理活性であるが、このことは、必ずしも、孔の形成を意味し

ない(下記参照)。

- ・ アミノ酸をD 体に変えても、活性が大きくは変わらない。したがって、リガンド/レセプター型の相互作用ではない。

リポソームや細胞の内容物を放出させる機構として、膜中にペプチドの多量体が比較的安定な孔を形成するモデル(barrel stave model、wormhole model) と、膜表面に吸着したペプチドが膜を不安定化させるモデル(carpet model、detergent-like model) などが提唱されている[1]。しかし、種々のペプチドと脂質膜での組合せ、濃度比、pH や温度等の条件で、実験結果やその解釈が変わる、膜貫通型のペプチドと膜表面吸着型のペプチドの違いは何か、など、ここ20 年近くの多くの研究にも関わらず、その作用メカニズムは、必ずしも明らかになっていない。

自然界に存在する膜破壊性ペプチドは、上記のような共通点はあるものの、そのアミノ酸配列自体には、大きな類似性は見られない。

Dufourcq らの研究グループは、塩基性アミノ酸のリシン(K) と中性アミノ酸のロイシン(L) の2 種類で両親媒性ペプチド(LK ペプチド) を合成し、生理活性があることを示した[3]。彼らは、LK ペプチドの生理活性の鎖長依存性などから、carpet またはdetergent-like な機構であると結論付けている。また、Sugihara らの研究グループは、LK ペプチドにトリプトファン(W)を1 個導入した両親媒性ペプチドを数種類用いて、その中のひとつ(Hel 13-5) はPC リポソームをナノチューブ構造へと変換させることを報告している[4]。しかし、どのような相互作用がこのような形態変化を引き起こすのかは明らかになっていない。

我々は、膜破壊性ペプチドと脂質膜との相互作用の詳細が依然として不明であることの原因として、これらの作用が、本質的に不均一かつ非平衡であるにも関わらず、これまでの研究手段の多くが、試料全体の平均量を平衡状態で測定していたことにあるのではないかと考えた。例えば、孔の形成なのか単なる吸着なのかを判断するためには、ペプチドが膜に対してどのように配向しているのかを調べれば良く、そのための最も有効な実験方法は、固体NMRや偏光FTIRである[2]。ところが、これらの方法では、非常に高濃度の脂質/ペプチド系を対象にして平衡状態での平均値を測定しているため、実際にペプチドが作用して内容物が放出する際の機構と、測定している系は直接的な関係がない可能性がある。より直接的に調べるためには、空間分解能と時間分解能を向上させた実験方法が不可欠である。

我々は、これまでに、ビデオレート膜流動性イメージング法[5] とミューラ行列顕微鏡[6] を開発してきた。ビデオレート膜流動性

イメージング法は、蛍光色素 Laurdan の性質を利用して、局所的な膜流動性変化を、光学顕微鏡の空間分解能、用いたカメラの時間分解能で画像化できるので、ペプチドが膜に吸着したり、孔を形成する際の膜流動性変化をリアルタイムで観察できると期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膜破壊性ペプチドの脂質膜への作用機序を、これまで開発してきた「膜流動性ビデオレートイメージング法」や「ミューラ行列顕微鏡」などの各種顕微分光法を中心的な実験手段とし、明らかにすることである。

3. 研究の方法

上記の顕微分光法以外に、基本的なデータは、高感度DSC 装置(DASM-4) や、蛍光分光光度計(AB-2) などで測定し、顕微分光の結果との整合性を確認しつつ、研究を進めた。特に、ペプチドと脂質膜との相互作用の詳細を理解するために重要なパラメータのひとつは温度である。膜の流動性や柔らかさが、相互作用の仕方を大きく変える。したがって、飽和リン脂質の相転移にペプチドがどのような影響を与えるのかを調べ、相図を描いて、それぞれの相での相互作用を明らかにすることが重要である。

4. 研究成果

これまで提案されてきたペプチドの相互作用モデルについて、図1に掲げる。

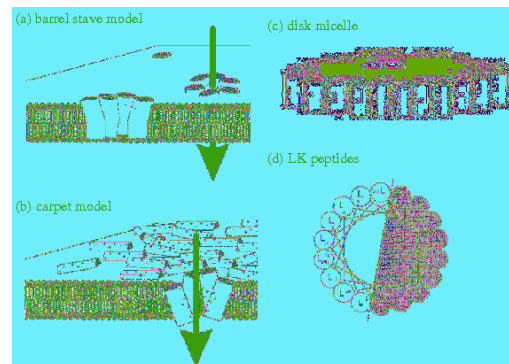


図1. ペプチドと膜の相互作用モデル

(1) メリチン/DMPC 系のディスクミセル/ベシクル転移

メリチン(ハチ毒の主成分、26 残基) は、最もよく研究されている膜破壊性ペプチドである。内藤らは、メリチンと DMPC リポソームを、ある比率に混ぜると、DMPC の相転移温度前後で、ディスクミセル構造(図1(c)) とジャイアントベシクルを可逆的に遷移すると報告した[2]。その時の局所的な膜流動性変化を捉えようと、我々は研究を開始した。

図2に、DMPC:メリチン=10:1の系の位相差および蛍光顕微鏡像を示す。過去の報告の報告と一致して、低温側では光学顕微鏡の分解能以下の構造物に分解し、高温側では球状の構造物が観測された。ところが、この高温側の球状構造物は、図2の蛍光顕微鏡像からわかるように、内容物が充填した構造物であり、ジャイアントベシクルではなかった。それは、偏光蛍光顕微鏡像において、蛍光色素の局所的な配向が全く見られないことから確かめられた。

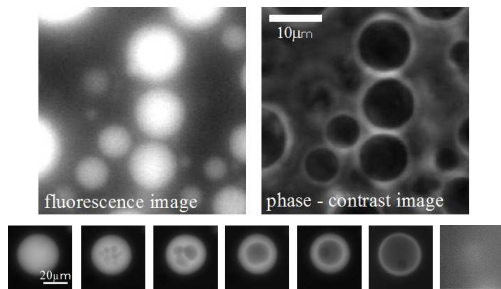


図2. DMPC/メリチン(10/1)系の蛍光顕微鏡画像(上左、下)と位相差画像(上右)。蛍光色素はLaurdan。上は50°Cでの画像。位相差画像ではベシクルに見える球状構造物が、実は内容物が充填していることがわかる。下図は、23°Cから徐々に降温した時に、球状構造物が消失していく様子。過去には途中で現れる空洞が、メリチンによって空けられた膜中の孔(穴)と解釈されたこともあるが、球状構造物が充填されていることから、その解釈はできない。スケールバーは10マイクロン。

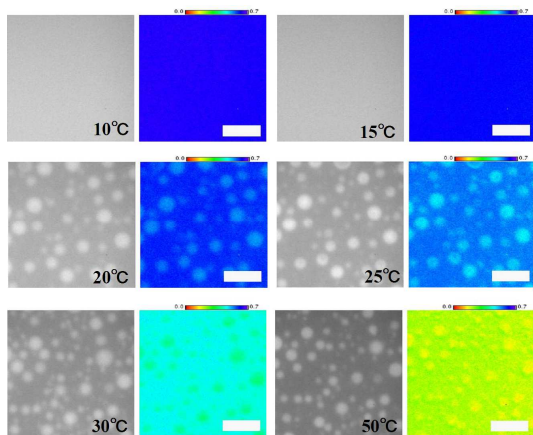


図3. DMPC/メリチン(10/1)系の蛍光画像(左)とGP画像(右)。GP画像は、紫色ほど硬い膜、赤ほど柔らかい膜であることを表す。転移の途中では、球状構造物と分解能以下のディスクミセルが共存するが、球状構造物の方が、膜が柔らかいことがわかる。スケールバーは10マイクロン。

図3に、ビデオレート膜流動性イメージ

ング法により観測したメリチン/DMPC系のGP画像を示す。低温側では、光学顕微鏡の分解能以下の構造のため、蛍光画像もGP画像も均一に見えるが、このときのGP値は、0.6付近で、DMPC単独膜のゲル相のGP値とほぼ同じであった。このことは、低温側で生成するディスクミセル構造(図1(c))が非常に硬いパッキングで、ほとんどのメリチンは膜外の淵に存在することを強く支持する。転移途中では、広い温度範囲でディスクミセルと球状構造物が共存し、球状構造物は周囲よりも柔らかい膜である。

以上の結果から、DMPC/メリチン系では、高温側で生成する球状構造物は、これまで報告されているようなジャイアントベシクルではなく、内容物が充填された通常の二分子膜構造でよりも柔らかい構造であることが明らかとなった。

(2) 球状構造物の磁場下での挙動

脂質二分子膜は、主に脂質炭化水素鎖の配向による磁気感受率の異方性のため、強い静磁場下で配向する。内藤らは、DMPC/メリチン系で、高温側で生成するジャイアントベシクルが、NMR測定の高磁場下で扁平に変形して、膜が磁場に対して揃い、その結果、配向膜としての解析で、メリチンの膜に対する配向角を計算した[2]。ところが、前節で示したように、球状構造物がジャイアントベシクルではないとすると、この描像は破綻する。そこで、我々はこの球状構造物の高磁場下での挙動を調べた。

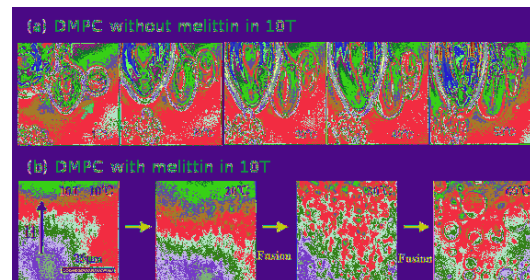


図4. 高磁場(10T)下でのDMPCリポソームの形態変化。メリチンのないDMPCリポソーム(a)では、温度の上昇に伴って、磁場方向に膜が配向するが、メリチンを添加して生成して高温側で生成した球状構造物(b)では巨視的な配向は全く見られない。

P^{31} -NMR測定の結果では、過去の報告と一致して、高温側で球状構造物が生成する領域では、磁場に対して膜が強く配向したことを示すスペクトルが観測された。ところが、図4に示すように、実際に10T(テスラ)の高磁場下では、メリチンを添加して生成した球状構造物では、膜の磁場への巨視的な配向は全く見られなかった[7]。 P^{31} -NMRスペクトルで

は配向スペクトルを示したのにも関わらず、顕微鏡下ではそれが見られなかったことを矛盾なく説明するためには、この球状構造体が、外部磁場を感じて球体内部で配向を組み替え可能な共連続構造(スポンジ構造)をもっていると考えるのが妥当である。

(3) DMPC/DHPC 系

これらの相互作用のあり方が一般性を持つものかどうかを明らかにするために、短鎖リン脂質である DHPC を膜破壊性ペプチドに見立てて、脂質膜との相互作用を検討した。その結果、低温側でのディスクミセル構造はメリチン系とほぼ同様な構造的特性をもつものの、高温側で現れる大きな構造物は、メリチン系で現れるような球状の構造体をとらず、微視的な相互作用のあり方も大きく異なっていることがわかった。これらの結果は、膜破壊性ペプチドの「両親媒性」という一般的な特性だけでは、脂質膜との相互作用を決めることはできず、ペプチドの個々のアミノ基と脂質分子との相互作用、ペプチド分子間の相互作用が膜破壊性ペプチドの活性に寄与していることを示すものである。

(4) ミューラ行列顕微鏡によるリポソームの観察

4x4 のミューラ行列は、偏光の変化を記述する最も一般的な行列であり、一度、試料のミューラ行列を測定すれば、その試料についてのすべての偏光応答を予測可能である。我々は、顕微鏡下で透過モードおよび落射蛍光モードでの試料の微視的なミューラ行列を測定するための顕微鏡を開発している[7]。

図5に、DMPC リポソームを Rh-DMPE 色素でラベルした落射蛍光モードでの蛍光画像と 4x4 のミューラ行列画像を示す。このミューラ行列画像から、光学顕微鏡の分解能での蛍光色素の配向、運動性などを算出することができる。残念ながら、現在のところ、膜破壊性ペプチドと生体膜との系には適用できていないが、これを適用することで、さらに詳細な相互作用メカニズムが解明できると期待される。

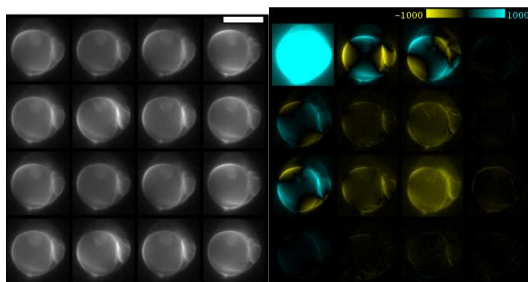


図5. ミューラ行列顕微鏡による DMPC リポソーム (15°C) の蛍光画像 (左) とミューラ行列画像 (右)。スケールバーは 10 ミクロン。

参考文献

- [1] B. Bechinger. Structure and function of membrane-lytic peptides. *Crit. Rev. Plant Sci.*, Vol. 23, No. 3, pp. 271-292, 2004.
- [2] A. Naito et al., "Conformation and dynamics of melittin bound to magnetically oriented lipid bilayers by solid-state p-31 and c-13 NMR spectroscopy", *Biophys. J.*, Vol. 78, pp. 2405-2417, 2000.
- [3] Laure Beven, et al., "The antibiotic activity of cationic linear amphipathic peptides: lessons from the action of leucine/lysine copolymers on bacteria of the class mollicutes.", *Euro. J. Biochem.*, Vol. 270, pp. 2207-2217, 2003.
- [4] T. Furuya et al., "Nanotubules formed by highly hydrophobic amphiphilic alpha-helical peptides and natural phospholipids.", *Biophys. J.*, Vol. 84, pp. 1950-1959, 2003.
- [5] T. Ohba et al., "Microscopic imaging of phase separation in giant liposome by using laurdan at video rate." *Jpn. J. Appl. Phys.*, Vol. 44, pp. 8733-8738, 2005.
- [6] 後藤晃, 大場哲彦, 大木和夫. ミューラ行列を用いた蛍光偏光イメージング. *光学*, Vol. 43, pp. 499-501, 2002.
- [7] 下記論文の(2)及び(3)
- [8] 下記論文の(1)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- (1) 大場 哲彦, 江田 泰明, 梅津 友平, 大木 和夫, "ミューラ行列顕微鏡によるリポソームの観察", *膜*, 査読無、22、121-124 (2010)
- (2) 玉造 広野, 大場 哲彦, 佐崎 元, 大木和夫, "脂質膜のダイナミクスとその磁場の影響について", *脂質生化学研究*, 査読無、50、335-337 (2008)
- (3) 玉造 広野, 大場 哲彦, 大木和夫, "磁場下における脂質膜及び脂質膜-メリチン系のダイナミクスに関する研究", *膜*, 査読無、20、61-64 (2008)

[学会発表] (計20件)

- (1) 江田 泰明, 梅津 友平, 大場 哲彦, 大木 和夫, "ミューラ行列顕微鏡によるリポソームの観察", 日本生物物理学会第48回年会、平成22年9月22日、仙台市
- (2) 児玉 篤治, 大場 哲彦, 大木 和夫, "示差走

査熱量測定及び蛍光分光測定によるメリチンと脂質膜の相互作用の研究”、日本生物物理学学会第47回年会、平成21年10月31日、徳島市

- (3) 玉造 広野, 大場 哲彦, 佐崎 元, 大木和夫、
“静磁場下における人工脂質膜のダイナミックスの顕微鏡観察(2)”、日本生物物理学学会第47回年会、平成21年10月31日、徳島市
- (4) 玉造 広野, 大場 哲彦, 佐崎 元, 大木和夫、
“Direct microscopic observation of biomembrane dynamics under a static magnetic field.”、The 6th Asian Biophysical Association Symposium、平成21年1月12日、香港、中国
- (5) Wu Li, 大場 哲彦, 大木 和夫、
“Molecular structure of sterols determines phase separation in model membranes”、The 6th Asian Biophysical Association Symposium、平成21年1月12日、香港、中国
- (6) 谷口 幸範, 田中 拓、武藤 健一、木内 泰、大場 哲彦, 大木和夫、
“Relationship between biological functions and physical properties of membrane inferred by microscopic imaging”、The 6th Asian Biophysical Association Symposium、平成21年1月12日、香港、中国
- (7) 児玉 篤治, 大場 哲彦, 大木 和夫、
“ Comparison of membrane physical property changes between PC membranes and PE membranes induced by melittin”、The 6th Asian Biophysical Association Symposium、平成21年1月12日、香港、中国
- (8) 江田 泰明, 大場 哲彦, 大木 和夫、
“Construction of Mueller Matrix imaging”、The 6th Asian Biophysical Association Symposium、平成21年1月12日、香港、中国
- (9) 江田 泰明, 大場 哲彦, 大木 和夫、
“ミューラ行列イメージングの構築(2)”、日本生物物理学学会第46回年会、平成20年12月4日、福岡市
- (10) 玉造 広野, 大場 哲彦, 佐崎 元, 大木 和夫、
“DMPC 膜及び DMPC/DHPC 二成分系へのラントノイドイオン Eu^{3+} の効果について”、日本生物物理学学会第46回年会、平成20年12月3日、福岡市
- (11) 児玉 篤治, 大場 哲彦, 大木 和夫、
“NaCl が DMPG の主転移に及ぼす影響”、日本生物物理学学会第46回年会、平成20年12月3日、福岡市
- (12) 玉造 広野, 大場 哲彦, 佐崎 元, 大木 和夫、
“静磁場下における人工脂質膜のダイナミックスの顕微鏡観察”、日本生物物理学学会第45回年会、平成19年12月22日、横浜市
- (13) Wu Li, 大場 哲彦, 大木 和夫、
“Structure-dependent Effects of Steroids on Membrane Phase Behaviors”、日本生物物理学学会第45回年会、平成19年12月22

日、横浜市

〔図書〕(計1件)

(1) 大木 和夫他、朝倉出版、現代物理学展開シリーズ8「生物物理学」、2010、1-107

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大場 哲彦 (OHBA TETSUHIKO)
東北大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：10250664

(2) 研究分担者

大木 和夫 (OHKI KAZUO)
東北大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：80115394

(3) 連携研究者

()

研究者番号：