

高時間分解観測による脂質膜を破裂・損傷させる抗菌性物質の作用機構の解明

[1] 組織

代表者：丹波 之宏

(鈴鹿工業高等専門学校)

対応者：山崎 昌一

(静岡大学電子工学研究所)

[2] 研究経過

抗菌活性を持つある種のペプチドや小分子は、細胞膜を損傷させ、その内容物の漏れを誘起する。近年、乳腺の分泌物に含まれる抗菌性ペプチド・ラクトフェリシン B が直径 10 μm 以上の巨大なリポソーム (GUV) をモデル細胞膜として用いた実験で、その内容物の非常に速い漏れを誘起する事が明らかとなった [1]。これは、従来得られてきた抗菌性物質による GUV からの漏れ、脂質膜に小孔を形成する代表的な抗菌性ペプチド・マガイニン 2 なら秒のオーダー、に比較し非常に高速であり、ビデオレートで観測不能な速度 (33 ミリ秒未満) であった。この現象は“破裂”と表現されたが、その原因が脂質膜上に形成された孔によるものなのか、あるいは脂質膜の一部が欠損したことによるのか、その“破裂”の詳細は不明である。本研究プロジェクトでは、この“破裂”の過程を高時間・高空間分解能観測し、GUV からの高速の漏れの原因、脂質膜の物性が“破裂”に与える影響を調べ、ラクトフェリシン B の作用メカニズムを明らかにする。

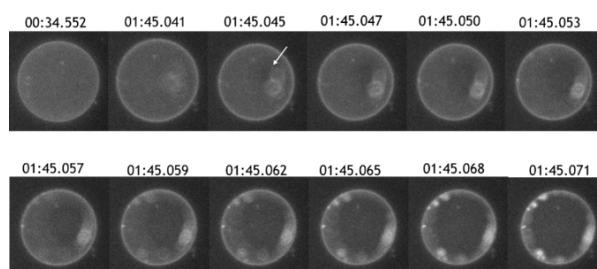
[1] *Biochemistry*, **54**, 5802-5814 (2015)

[3] 成果

(3-1) 研究成果

一般に、脂質膜と外来物質の相互作用の研究では、直径数百 nm のリポソーム (LUV) を多数含む懸濁液をモデル細胞膜系として用い、その相互作用を分光器などにて調べる。しかし、この手法では 1 個のリポソームについての情報が平均化されてしまい、抗菌性ペプチドによる孔形成といった素過程の探求には限界がある。そこで我々は、直径 10 μm 以上の巨大なリポソーム (GUV) を用い、外来物質と 1 個の GUV の相互作用を直接的に観測し、それを統計評価する新規に開発した方法論 (単一 GUV 法) に

よりこの問題に取り組んだ。ただし、ラクトフェリシン B が誘起する GUV の内容物の漏れは非常に高速で起こる。そこで、過年度の共同研究にて開発した数ミリ秒程度の高時間分解能で GUV と外来物質の相互作用を観測する測定系の適用をラクトフェリシン B と GUV の相互作用の観測に試みた。本プロジェクトは本年度が初年度であり、まずラクトフェリシン B が GUV に引き起こす構造変化を調べた。脂質膜にはジオレオイルフォスファタイジルコリン (DOPC) とジオレオイルフォスファタイジルグリセロール (DOPG) の混合膜を用い、これを蛍光ラベルし GUV を作成した。マイクロピペットを用いて GUV 周辺の溶液を 2.5 μM のラクトフェリシン B 水溶液に置換した。下図にその蛍光顕微鏡による観測結果を示す。



画像の上にある数字は、ラクトフェリシン B との相互作用を開始してからの秒数である。輝度の高さは、脂質膜に含まれる蛍光プローブによるもので脂質膜の分布を示している。相互作用を開始してから 105.041 秒までは、GUV の脂質膜の分布に目立った変化は見られなかった。ところが、その 4 ミリ秒後の 105.045 秒、図中白抜き矢印の位置に、突然脂質の密度の薄い領域が観測された。この脂質膜が欠損した領域はその後、急激に拡大し、それとともに GUV の脂質膜上には輝度が高い、すなわち脂質の密度が高い塊が出現した。既に報じられている、GUV の内容物の漏れの観測結果とあわせれば、この脂質膜の欠損領域は脂質膜に形成された孔といえる。以上、1 例のみ示したが、この様にラクトフェリシン B が GUV に誘起した“破裂”を初めて詳細にとらえることに成功した。

(3-2) 波及効果と発展性など

ある種の抗菌性物質が誘起する脂質膜の構造変化は、しばしば“破裂”と表現される。特にラクトフェリシンBはこれを高速で誘起する。しかし高速であるがゆえに、旧来の研究手法ではその原因の特定が困難であった。そこで本研究では、新規に開発された高時間分解観測が可能な測定系を用い、ラクトフェリシンBが誘起するGUVの構造変化の可視化を試み、これが可能であることを示した。今後は、脂質膜に誘起された構造変化をより詳細を調べ、内容物の高速の漏れの原因を明らかにしていく。本研究プロジェクトは脂質膜の“破裂”を誘起する抗菌性物質の作用機構に貴重な知見を与える。

[4] 成果資料

本プロジェクトは、初年度であり次年度も共同研究は継続し行っていく。その成果はより詳細な検討をふまえ学術雑誌に投稿する予定である。