脂質膜とペプチドとの相互作用に関する分子論的考察

松 崎 勝 巳

京都大学薬学部 ☎ 606-01 京都市左京区吉田下阿達町

Molecular-level Considerations on Lipid Membrane-peptide Interactions

Katsumi Matsuzaki

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto
University, Sakyo-ku, Kyoto 606-01, JAPAN

We have investigated the interactions of three classes of antimicrobial peptides (hypelcin A, trichopolyn I, and magainins) with lipid bilayers by using several physicochemical techniques (fluorescence, circular dichroism, infrared absorption, and differential scanning calorimetry) to obtain basic information on the molecular-level mechanisms for their bioactivities. In zwitterionic phosphatidylcholine membranes, hydrophobic peptides, hypelcin A and trichopolyn I, form helices, deeply penetrating the hydrophobic region of the bilayers. There are no specific interactions between membrane-bound peptide molecules. The penetration disrupts the lipid packing, permeabilizing the bilayers. The membrane action of hypelcin A, the larger peptide, is three fold stronger. In contrast to these hydrophobic peptides, cationic magainin peptides specifically bind with acidic lipid bilayers, e.g., phosphatidylglycerol, to form amphiphilic helices. Electrostatic interactions are important in the binding process. The helical rods lie parallel to the membrane surface and form an aggregate. Magainins cause minimal perturbation of the hydrophobic core of the membranes, coinciding with much weaker membrane permeabilization activity. However, detailed permeabilization mechanisms are a subject of further study.

Key words : peptide-lipid interaction, hypelcin A, trichopolyn I, magainins, membrane permeability

1. はじめに

ペプチドと脂質膜との相互作用は、様々な観点から研究がなされており^{1, 2)}, 大きく次のように分類できる。

(1) 生理活性ペプチドの作用機序の解明 (抗菌性ペプチドやホルモンなど)

(2) タンパク質-脂質分子集合体の構築原理の探求 (生体膜, 血漿リポタンパク質など)

(3) ペプチド-膜相互作用の関与する生物学的プロセ

スの分子論的理解 (生合成されたタンパク質のターゲティング, ウイルス感染など)

我々はこれまで, 菌細胞膜の透過性亢進が作用機構であると考えられる数種の抗菌性ペプチド (hypelcin A, trichopolyn I, magainins, tachyplesin I) について上記 (1) の観点から, 生体膜の基本構造をなす脂質膜との相互作用を分光学的・熱的測定法を用いて研究してきた^{3~11)}. この他, この範疇に入るペプチドとしては, alamethicin, melittin, cecropins, defensins, gram-

Hypelcin A-I

Trichopolyn I

図1. hypelcin A (上) と trichopolyn I (下) の構造。

hypelcin A は構造のよく似た数種の混合物からなるので、主要な A-I についてのみ示した。親水性アミノ酸はアウトラインで示してある。

icidin, gramicidin S などがあり、いずれもアミノ酸十数個～三十数個からなる比較的小さなペプチドである。これらペプチドによる膜の透過性亢進の機構としては、チャンネル形成・膜構造の損傷・可溶化等が考えられる。分子論的に作用機構を明らかにするには、ペプチドの膜中でのコンホメーション・配向・会合状態、ペプチドによる脂質分子のコンホメーション変化・配向変化や膜透過性変化、さらには膜の形態変化を詳細に検討しなければならない。ここでは、電荷を持たない疎水性ペプチドである hypelcin A と trichopolyn I および正電荷を持つ両親媒性ペプチドである magainins について著者らが行った研究結果について述べることにする。特に断らない限り、実験はすべて 30°C で行った。

2. Hypelcin A および trichopolyn I³⁻⁵⁾

これらは不完全菌類から得られるペプチドであり、異常アミノ酸である α -aminoisobutyric acid (Aib) を高率で含んでいて疎水性が高い(図1)¹²⁻¹⁶⁾。グラム陽性菌や真菌に対して抗菌性を示す。まず、膜透過性亢進作用を検討するため、卵黄 phosphatidylcholine リポソームに内包した蛍光色素カルセインの漏出を調べた^{3, 5)}。内包した高濃度 (70 mM) のカルセインは二量体を形成し自己消光をしているが、漏出すると著しい

希釈を受けるため単量体となり、蛍光を発するようになることを利用して膜のバリアー能を評価することができる。ここで、透過性上昇が起こるステップを考えてみる。まず、ペプチドが膜に結合する。このときの結合の仕方すなわち結合等温線はペプチドの膜内での会合性を反映する¹⁷⁾。引き続いて、膜に結合したペプチドがなんらかのメカニズムで膜構造を乱し、内包物を漏出させる。我々はこの2つのステップを分離して評価した。

漏出速度 (ペプチド添加1分後の漏出%で表現) は、ペプチド濃度 $[P]_0$ が高いほど、また脂質濃度 $[L]$ が低いほど、大きかった (図2a)。このことは、 $[P]_0$ の絶対値ではなく、脂質1分子当たりの結合ペプチド量 r が透過性変化を決定していることを示している。そこで図2で、ある一定の漏出速度 (例えば点線で示した 40%/1 min) を示す4つの実験条件 ($[P]_0$ と $[L]$ の組み合わせ) は、同じ r を与える条件としてよい。結合平衡に達しているので、対応する $[P]_f$ (フリーのペプチド濃度) の値も共通となる。material balance の式

$$[P]_0 = [P]_f + r[L] \quad (1)$$

を考慮すると、この4つの条件で $[L]$ に対し $[P]_0$ をプロットすると直線となり、切片と勾配から $[P]_f$ と r がそれぞれ求まることになる (図2b)。このようにして、種々の漏出速度について $[P]_f$ と r との関係 (結合等温線) を求めたのが図3aである。同時に得られる漏出速

図2. hypelcin A による卵黄 phosphatidylcholine small unilamellar vesicle の透過性変化³⁾.

- a) 種々の脂質濃度 $[L]$ におけるペプチド添加 1 分後の内包カルセインの漏出パーセントをペプチド濃度 $[P]_0$ に対してプロットした。
b) a) で同じ漏出パーセントを示す 4 点について、 $[P]_0$ に対して $[L]$ をプロットした。

図3.

- a) hypelcin A と trichopolyn I の卵黄 phosphatidylcholine small unilamellar vesicle への結合等温線。
 $[P]_f$: フリーのペプチド濃度, r : 脂質 1 分子当りの結合ペプチド量。
b) r と透過性変化の関係。

度と r との関係を図3 b) に示した。これらのペプチドの膜への結合は分配平衡(結合等温線が直線)で説明され、膜中ではペプチド同士の顕著な会合はないことがわかった。分配係数(直線の傾き)は hypelcin A のほうが約 3 倍大きかった(図3 a)。膜透過性変化に必要な結合ペプチド量は hypelcin A のほう(脂質約 100 分子当りペプチド 1 分子)が約 1/3 ですむことがわかった(図3 b)。こうした hypelcin A の膜作用の強さは溶血性にも反映されていた⁵⁾。また、これらのペプチドはリボソームの融合を惹起するが、透過性変化は融合に伴うもので

はないことを明らかにした^{4, 5)}。

次に、これらペプチドの膜透過性上昇作用の機構を探るため、膜のゲルー液晶相転移に及ぼす影響について DSC を用いて検討した^{3, 5)}。これらペプチドの添加により dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) の相転移は消失した。相転移に伴うエンタルピー変化は主に脂質の炭化水素鎖の融解に基づくものと考えられているから、これらのペプチドは膜の疎水部に大きな影響を与えていると考えられる。

そこで、さらに詳細に分子レベルでの知見を得るため、

図4. ATR法の原理⁵⁾. 図5. 一軸配向モデル⁵⁾.

FTIR 偏光 ATR 測定を行った⁵⁾. この方法の概略を図4に示す. 高屈折率の Ge 板の上面に DPPC とペプチドからなる配向膜を調製する. この板に入射角 45 度で 2 種類の赤外偏光 (電場ベクトルが入射面に平行および垂直) を入射する. 光は Ge-膜界面で全反射を繰り返す, 入射した方向と逆方向に出てゆき検出される. このとき, 赤外光は膜側に $0.2 \sim 0.8 \mu\text{m}$ しみ出すので, 膜に関する情報が得られる. 赤外光の吸収強度は光の電場ベクトルと吸収の遷移モーメントベクトルの内積の二乗に比例するから, 2 種の偏光に対する吸光度の比から Ge 板に対する遷移モーメントの配向を知ることができ

る. すなわち, 用いる赤外吸収バンドによってペプチドや脂質分子の配向を評価できる. 我々は, 十分厚い膜 ($6 \mu\text{m}$) を重水で水和して用いた. この条件下で, 図5に示した一軸配向を仮定すると, 問題とする遷移モーメントの配向は (2) 式で求められる.

$$S \cdot S' = (R - 2.00) / (R + 1.45) \quad (2)$$

ここで, R は二色比と呼ばれ 2 種類の赤外偏光による吸光度の比 ($\Delta A_{\parallel} / \Delta A_{\perp}$) である. S, S' は z 軸のまわりの分子軸の, および分子軸まわりの遷移モーメントのそれぞれオーダーパラメーターである.

$$S = (3 \cos^2 \alpha - 1) / 2 \quad (3)$$

$$S' = (3 \cos^2 \theta - 1) / 2 \quad (4)$$

図6aはDPPCの炭化水素鎖のC-Hの対称伸縮振動の波数の温度変化である. ペプチドを添加していない場合, 41°C 付近で急激な高波数シフトが見られた. これは炭化水素鎖の融解に伴い, オールトランス型からゴーシュ型が混じったコンホメーションになったことを示している. DPPCに5 mol% の hypelcin A を添加した場合も同様であった. しかし, trichopolyn I を添加した場合には, 高波数シフトが消失し, 高温でもオールトランス型に近いコンホメーションをとっていることがわかった.

図6bは炭化水素鎖のオーダーパラメーター S の温度変化である. DPPC のみの場合, ゴーシュ型の増加に由来するオーダーの低下が 41°C 付近で見られた. trichopolyn I を添加した場合には, 全温度領域でオーダーが低下した. 波数変化からはゴーシュ型の増加が観測されなかったことから, trichopolyn I の添加により脂質の配向軸自体が z 軸から傾いたと考えられる. hy-

図 6. FTIR 偏光 ATR 法による脂質炭化水素鎖のコンホメーションと配向⁵⁾.
 ペプチド/DPPC (1/20) 配向膜を重水で水和して測定. (◆Ge plate, 45° incidence, D₂O)
 a) C-H 対称伸縮振動の波数の温度変化.
 b) DPPC 炭化水素鎖のオーダーパラメーターの温度変化. HP : hypelcin A, TP : trichopolyn I.

表 1. FTIR 偏光 ATR 法によるペプチドのコンホメーションと配向

Peptide	Temp. (°C)	Frequency (cm ⁻¹)	Order parameter (α)
Hypelcin A	22	1658.1	-0.05 (57°)
	50	1658.9	0.08 (52°)
Trichopolyn I	22	1666.7	-0.09 (58°)
	50	1666.7	-0.09 (58°)

*DPPC/Peptide (20/1) film hydrated with D₂O

図 7. 脂質膜中での hypelcin A (上)と trichopolyn I (下) の存在状態の模式図 (液晶温度).

pelcin A を添加した場合には、この傾向がさらに顕著であったが、この事実は上述した膜作用の強さを説明することができる。

次に、ペプチドのコンホメーションならびに配向について検討した (表 1). アミド I の波数はペプチドの二

次構造を反映する¹⁸⁾. hypelcin A は 1658 cm⁻¹ 付近で、 α -ヘリックス構造であることがわかった。一方、trichopolyn I は 1667 cm⁻¹ 付近で、 3_{10} -ヘリックス構造であった。これらペプチドがヘリックス構造をとることは、CD スペクトルの結果からも支持された。一般に、Aib を含むペプチドのうち、10 残基以下の短いものは 3_{10} -ヘリックス構造をとり、それより長い物は α -ヘリックス構造をとることが知られている¹⁹⁾。これらのヘリックスの膜内での配向を調べたところ、表 1 に示したように S はほぼ 0 となった。すなわち、ペプチドはランダムに配向しているか、あるいは、偶然マジックアングル (54.7 度) 近傍の角度をもって配向している。いずれにしても、ヘリックスは膜の疎水部深くに侵入しているが、膜面に平行あるいは垂直といったきちんとした入りかたをしていない。このため周りの脂質の配向を乱すものと考えられる。

以上の結果を模式的に示したのが図 7 である (液晶状態)。hypelcin A のヘリックスが折れ曲がっているの

図8. magaininsのアミノ酸配列(左)とヘリックス車輪(右).
magainin 2は magainin 1 と()内の2残基が異なる. 親水性アミノ酸はアウトラインで示してある.

図9. 5 W - magainin 2 の蛍光スペクトル⁹⁾.
励起 280 nm. $[P]_0$ は $5 \mu M$. $[L]$ は卵黄 phosphatidylglycerol (large unilamellar vesicle) 濃度.

は、14 番目の Pro による。また、C 末端領域にある Gln, Phol のプロトン供与基は脂質のリン酸基と水素結合しているらしいことが、IR のデータから示唆された⁵⁾。

3. Magainins^{6~9)}

Magainins は 1987 年 NIH の Zasloff によってアフリカツメガエルの皮膚より単離された抗菌性ペプチドで、この動物の host-defense system に関与していると考えられている²⁰⁾。本ペプチドの抗菌スペクトルは広く、グラム陽性・陰性菌、真菌類に有効である。アミノ酸配列(図 8)を見ると、荷電アミノ酸(主に塩基性、

アウトラインで示してある) が周期的に繰り返され、それらの間に 2~4 個の疎水性アミノ酸が挟まれていることから、両親媒性ヘリックスを形成することが予想される (図 8 右、ヘリックス車輪)。事実、我々は、magainin 1 がマイナス荷電をもつ酸性リン脂質膜とのみ相互作用し、両親媒性ヘリックスを形成し、膜透過性を上げることを見いだした⁶⁾。両親媒性ヘリックスを形成するには、プラス荷電が近接して存在しなければならず、反発が生じる。膜面のマイナス荷電がこれを中和する必要があると思われる。magainin の膜への結合性における静電的相互作用の重要性は、媒質の塩濃度の減少により結合性が低下することによって裏付けられた⁷⁾。また、細菌の細胞膜との相互作用に関しても、酸性リン脂質との相互作用が重要であることを見いだした⁸⁾。

膜との相互作用をさらに詳細に検討するため, magainin 2 の 5, 12, 16 番目の Phe をそれぞれ Trp に 1 残基置換した誘導体を合成し, 菌細胞膜に豊富に存在する酸性リン脂質である phosphatidylglycerol (卵黄由来) からなる膜との相互作用を調べた⁹⁾. これらの誘導体は膜中でのコンホメーションや膜透過性亢進において親ペプチドと同等であることを確認した. 膜に結合すると Trp の蛍光はブルーシフトし強度が増大し, Trp が膜の疎水部に存在することがわかった (図 9). この蛍光変化を指標にして結合等温線を求めることにした. 解析にはしばしば二状態モデルが用いられるが, ここではより一般的な方法を適用した. 膜が存在しない時, Trp の蛍光強度は次式で与えられる.

$$F_0 = k_f [P]_0 \quad (5)$$

図 10. 種々のペプチド濃度における, 脂質添加に伴う 5 W-magainin 2 の蛍光強度 F (336 nm) の変化⁹⁾.
 F_0 は脂質なしのときの F .

図 12. 視差法により見積った各 Trp 残基の膜中心からの距離と r との関係.
 n -doxylphosphatidylcholine の構造もあわせて示した.

一方, 膜存在下では,

$$F = k_f [P]_f + k_b r [L] \quad (6)$$

ここで, k はペプチドの蛍光係数 (量子収率) であり, 添え字 f, b はそれぞれフリーおよび結合型を表す. k_f は定数であるが, k_b は結合量 r に依存する可能性がある. (5) (6) 式から, (7) 式が得られる.

$$(F - F_0) / [L] = (k_b - k_f) r \quad (7)$$

右辺は r のみに依存する関数であるから, 図 10 で縦軸の値が同じ点 (例えば破線で示した 1 の点) は, 同じ r , したがって同じ $[P]_f$ を持つことになる. 図 2 から図 3 を求めたのと同じ方法で結合等温線を求めたところシグ

図 11. 3 種の Trp 置換 magainin 2 の卵黄 phosphatidylglycerol (large unilamellar vesicle) への結合等温線⁹⁾.

図 13. 脂質膜中での magainin ヘリックスの配向の模式図.

モイド型 (正の協同性) となった (図 11). 正電荷を持ったペプチドの結合により, 膜のマイナス荷電は減少するので, ペプチド-膜間の静電引力は徐々に減少するはずである. にもかかわらずこのような正の協同性を示すということは, ペプチド同士が膜内で会合している可能性を示唆するものである.

Trp 残基の膜中での深さを推定するため n -doxyl-phosphatidylcholines ($n = 5, 10, 12$, 図 12 下) を用いて蛍光消光実験 (視差法²¹⁾) を行ったところ, いずれの Trp 残基も膜の疎水部の中心から r によらず 0.8 ~ 1 nm の距離にあり (図 12), magainin ヘリックスは膜表面付近に横たわっていることが明らかと

なった(図13)。これはヘリックスの両親媒性から見て妥当なものである。このような配向でのペプチド同士の会合としては、逆平行ヘリックスを基本構造としたものである可能性が考えられるが、詳細はいまのところ明らかでない。

膜透過性変化はペプチドによる膜構造の乱れである可能性があるが、その力はかなり弱い。なぜなら、magainin は dipalmitoylphosphatidylglycerol の相転移に殆ど影響しないし、また、膜透過性変化に必要な結合ペプチド量はほぼ同じ分子サイズの hyelpein A に比べておよそ10倍必要であるからである⁷⁾。しかし、大部分のペプチドは膜面に平行であるが、ごく一部のペプチドが膜を貫通して pore を形成している可能性もある。詳細な膜透過性亢進のメカニズムは今後の検討課題である。

4. おわりに

以上、筆者の行った研究のうち、3種の膜作用性の抗菌性ペプチドについての結果を述べた。このような membrane-lytic ペプチドについては、polymyxins, alamethicin, melittin などに関して膨大な研究がこの20年間になされている^{1, 2)}が、ペプチドが膜にどのような侵入の仕方をして、その結果、なぜ透過性亢進が起こるのかという本質的なことに関しては依然、議論の分かれるところである。また、生体膜では膜電位が存在するが、これがペプチドと脂質膜との相互作用にどのような影響を及ぼしているかは、生物物理化学的にきわめて重要な問題であるにもかかわらず、ほとんど何も解かっていないのが現状であり、今後の研究の進展を待たねばならない。

最後に、本シンポジウムでの発表の機会を与えてくださいました委員の諸先生に深謝致します。また、本研究は京都大学薬学部 藤多哲朗教授、藤井信孝教授、および京都大学化学研究所 竹中亨教授の各研究室との共同研究によるものであり、ここに感謝致します。

参考文献

- 1) M. S. P. Sansom, *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **55**, 139 (1991).
- 2) E. T. Kaiser F. J. Kézdy, *Ann. Rev. Biophys.* *Biophys. Chem.* **16**, 561 (1987).
- 3) K. Matsuzaki, S. Nakai, T. Handa, Y. Takaishi, T. Fujita and K. Miyajima, *Biochemistry* **28**, 9392 (1989).
- 4) K. Matsuzaki, Y. Takaishi, T. Fujita and K. Miyajima, *Colloid Polym. Sci.* **269**, 604 (1991).
- 5) K. Matsuzaki, T. Shioyama, E. Okamura, J. Umemura, T. Takenaka, Y. Takaishi, T. Fujita and K. Miyajima, *Biochim. Biophys. Acta* **1070**, 419 (1991).
- 6) K. Matsuzaki, M. Harada, T. Handa, S. Funakoshi, N. Fujii, H. Yajima and K. Miyajima, *Biochim. Biophys. Acta* **981**, 130 (1989).
- 7) K. Matsuzaki, M. Harada, S. Funakoshi, N. Fujii and K. Miyajima, *Biochim. Biophys. Acta* **1063**, 162 (1991).
- 8) K. Matsuzaki, M. Harada, S. Funakoshi, N. Fujii and K. Miyajima : "Peptide Chemistry 1990" (Y. Simonishi, ed.) p. 389, Protein Research Foundation, Osaka, (1991)
- 9) K. Matsuzaki, O. Murase, H. Tokuda, S. Funakoshi, N. Fujii and K. Miyajima : "Peptide Chemistry 1991" (A. Suzuki, ed.) p.269, Protein Research Foundation, Osaka, (1992).
- 10) K. Matsuzaki, M. Fukui, N. Fujii and K. Miyajima, *Biochim. Biophys. Acta* **1070**, 259 (1991).
- 11) K. Matsuzaki, M. Fukui, N. Fujii and K. Miyajima, *Membrane Symposium* **3**, 76 (1991).
- 12) K. Fuji, E. Fujita, Y. Takaishi, T. Fujita, I. Arita, M. Komatsu and N. Hiratsuka, *Experientia* **34**, 237 (1978).
- 13) T. Fujita, Y. Takaishi and T. Shiromoto, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **413** (1979).
- 14) T. Fujita, Y. Takaishi and A. Okamura, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **585** (1981).
- 15) T. Fujita, Y. Takaishi, K. Matsura, Y. Takeda, Y. Yoshioka and H. Brückner, *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 2870 (1984).
- 16) T. Fujita, Y. Takaishi, H. Moritoki, T. Ogawa and K. Tokimoto, *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 1822 (1984).
- 17) G. Schwarz, *Biochimie* **71**, 1 (1989).
- 18) D. M. Byler and H. Susi, *Biopolymers* **25**, 469 (1986).
- 19) D. F. Kennedy, M. Crisma, C. Toniolo and D. Chapman, *Biochemistry* **30**, 6541 (1991).
- 20) M. Zasloff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5449 (1987).
- 21) A. Chattopadhyay and E. London, *Biochemistry* **26**, 39 (1987).

(受付 1992年8月24日)