薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
101 (9) 774—779 (1981)

グラミシジン S とリン脂質膜の相互作用に関する熱的研究

中垣正幸, 半田哲郎, 瀬原千華子*

京都大学薬学部

Thermal Studies on Interactions between Gramicidin S
and Phospholipid Membranes

MASAYUKI NAKAGAKI, TETSUROU HANDA and CHIKAKO SEHARA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University,
Yoshida-Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto

(Received March 2, 1981)

The interactions between lipid membranes composed of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE) and a polypeptide antibiotic, gramicidin S (GS), were investigated by means of differential scanning calorimetry (DSC). With increasing the GS composition, new membrane phases, which exhibited phase transitions at lower temperature than that of the pure lipid membranes, were formed. On the basis of the phase rule, these new membrane phases were considered to be lattice complexes of GS and lipids. By NMR measurement, the molecular motion of DPPC associated with GS was found to be considerably elevated. The interactions between GS and membranes composed of mixed lipids, DPPC and DPPE, were also studied.

Keywords—lipid membrane; gramicidin S; DSC; phase transition; lattice complex

脂質膜と蛋白やポリペプチドとの相互作用に関する研究は、生体膜の機能を理解する上で大変重要である。脂質膜と蛋白の相互作用は、単に蛋白の高次構造や機能に変化をもたらしただけではなく、脂質膜の性質にも影響を与える事が知られている¹⁾。ポリペプチドと脂質膜の相互作用としては gramicidin A などのイオノフォアと脂質 2 分子膜を用いた研究がよく行なわれている²⁾。脂質膜と蛋白の相互作用は極めて複雑と考えられるが、イオノフォアなどのポリペプチドは蛋白に比べると分子量も小さく脂質膜に対する効果は比較的理解しやすいと思われる。

Gramicidin S は *Bacillus brevis* より産出され、10 個のアミノ酸より成る環状ペプチドである。選択的なイオノフォアとしての機能は有しないがグラム陽性菌に対し強力な抗菌力を持っており、その細胞膜に作用し膜透過性を著しく変化させ、菌体の細胞質を流出させると考えられている³⁾。本研究では、リン脂質の代表的なものである L- α -dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) あるいは L- α -dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE) により形成される脂質 2 分子膜と gramicidin S (GS) の相互作用を、示差走査熱量計 (DSC) を用いて脂質 2 分子膜の相化学的性質に与える GS の影響を測定することによって検討した。

結 果

DPPC と GS の混合系

DPPC と GS の混合物より形成されるラメラ相 (脂質 2 分子膜が薄い水層をはさんでサンドイッチ状に重なり合ったもの) の DSC 測定結果を Fig. 1 に示した。結果はサンプルの昇温時に得られたものであり、下向きに吸熱 (endothermic) を示す。DPPC のラメラ相は 42°C にゲル (S) と液晶 (LC) の相転移温度を有する。これにわずかの GS が添加されると、この DPPC に固有の値はやや低温側の 40°C に変化するがその後は一定である。一方、GS のモル分率が 0.16—0.20 より大きい時、35°C 付近に新しい吸熱が出現してくるが GS のモル分率

Fig. 1. DSC Curves of DPPC-GS Mixed Membranes

Mol fraction of DPPC (a) 1, (b) 0.98, (c) 0.84, (d) 0.80, (e) 0.72, (f) 0.61, (g) 0.55.

Fig. 2. Peak Areas (per a DPPC molecule) of DPPC-GS Mixed Membranes (X_{GS} : mol fraction of GS)

○, peak areas around 40°C ($S_h \rightarrow LC_h$).
●, peak areas around 35°C ($S_1 \rightarrow LC_1$).
The value for DPPC without GS were taken as 100.

Fig. 3. Transition Temperatures vs. X_{GS}

The diagram is regarded as the phase diagram of DPPC-GS mixed membranes. (a) S_h , (b) LC_h , (d) S_1 , (e) LC_1 .

Fig. 4. DSC Curves of DPPE-GS Mixed Membranes

Mol fraction of DPPE (a) 1, (b) 0.95, (c) 0.89, (d) 0.87, (e) 0.82.

0.35 あたりで脂質固有の相変化を示す吸熱はほとんど見い出せなくなり、低温側の吸熱のみが残るようになった。これ等の吸熱ピークはサンプルの降温時には発熱のピークとして現われるが、その相変化開始温度は昇温時とほとんど変わらなかった。

Fig. 2 に DPPC-GS 系の示す吸熱ピークの DPPC 当り面積を示した。純粋 DPPC の示すピークの面積を 100 として図示した。40°C に現われる DPPC の相変化に伴う吸熱は GS の添加量の増大に伴って減少し、GS のモル分率 $X_{GS}=0.36$ 付近で消失する。低温側の吸熱は、 $X_{GS}=0.18$ 付近から認められるようになり、 X_{GS} が増大す

Fig. 5. Peak Areas (per a DPPE molecule) of DPPE-GS Mixed Membranes (X_{GS} : mol fraction of GS)

- , peak areas at the higher temperature ($S_h' \rightarrow LC_h'$).
- , peak areas at the lower temperature ($S_l' \rightarrow LC_l'$).

The value for DPPE without GS were taken as 100.

Fig. 6. Transition Temperatures vs. X_{GS}

The diagram is regarded as the phase diagram of DPPE-GS mixed membranes. (ab) S_h' , (bc) LC_h' , (de) S_l' , (ef) LC_l' .

るとピーク面積は増大した。これ等の測定された吸熱ピークは DPPC-GS 系の相変化を示すものと考えられるが、組成に対する変化を Fig. 3 に示した。40°C 付近のゲル相 (S_h) $\leftrightarrow$ 液晶相 (LC_h) 相変化点と、35°C 付近のゲル相 (S_l) $\leftrightarrow$ 液晶相 (LC_l) 相変化点を組成に対してプロットした。 $X_{GS} < 0.18$ では前者のみが、 $0.18 < X_{GS} < 0.37$ では両者が、 $X_{GS} > 0.37$ では後者のみが検出される事が解る。

DPPE と GS の混合系

DPPE と GS とから形成されるラメラ相の昇温による DSC 測定結果を Fig. 4 に示した。DPPE はそのゲル (S_h) $\leftrightarrow$ 液晶 (LC_h) 転移点を 63°C に有するが、GS の添加に伴いこの温度は下がり、かつその吸熱量も減少していく。 $X_{GS} = 0.18$ 付近では温度は 57°C まで低下するが、吸熱量はほとんど 0 となった。一方、これとは別に GS 添加に伴い $X_{GS} = 0.05$ 付近より 53°C 付近に別のゲル (S_l) $\leftrightarrow$ 液晶 (LC_l) 相変化の吸熱が現われ、こちらの方の吸熱量は増大していった。Fig. 5 に DPPE と GS 混合系の 2 つの相変化点における DPPE 1 分子当りの吸熱ピーク面積を組成に対して示した。高温側の相変化点 ($S_h' \leftrightarrow LC_h'$) は $X_{GS} = 0.3$ 付近で消失した。サンプルの降温時にはこれ等の吸熱は発熱となって現われるが、その温度は昇温時とほぼ一致した。これ等の吸熱温度と DPPE-GS 組成の関係を Fig. 6 に示した。

DPPC-DPPE 混合膜に対する GS の効果

初めに DPPC と DPPE の混合ラメラ相の DSC 測定を行なって $S \leftrightarrow LC$ 相転移温度を求めた。その結果が Fig. 7 である。この場合は、DPPC や DPPE のみによるラメラ相あるいは、これ等に GS が添加された場合と異なり、昇温と降温で、現われる吸発熱の位置に著しい差異が見いだされた。

次に DPPC と DPPE の混合膜に対する GS の効果を検討した。この際には、GS のモル分率を 0.41—0.47 に保ち、DPPC と DPPE の組成を変化させた。すなわち、Fig. 3 または Fig. 6 よりわかるように、この組成は、DPPC または DPPE ラメラ相固有の吸熱が完全に消失し、新しく低温側に現われる吸熱ピークのみが検出される組成である。この混合系の吸発熱の温度と脂質組成の関係を Fig. 8 に示した。脂質中の DPPC モル分率 1—0.58 において、相転移温度は吸熱、発熱で一致し、かつ、これらの温度は DPPE の添加にかかわらずほぼ一定値となった。また、DPPE モル分率 1—0.58 においても吸発熱の温度は一致したが、この場合、その温度は、図に

Fig. 7. Transition Temperatures of DPPC-DPPE Mixed Membranes (X_{DPPE} : mol fraction of DPPE)

○, gel(S)→liquid crystal (LC).
●, liquid crystal (LC)→gel (S).

Fig. 8. Transition Temperatures of DPPC-DPPE Mixed Membranes with GS

The mol fraction of GS (X_{GS}) was kept at $X_{GS}=0.41-0.49$.

○, gel→liquid crystal.
●, liquid crystal→gel.

示すように脂質組成によって変化した。中間の組成においては吸熱ピークが2段になって現われる事がわかったが、この領域ではピークの位置や温度に関して実験上での再現性があまり良くなかった。

考 察

DPPC 又は DPPE と GS の相互作用

Fig. 3 に DPPC-GS 混合系が示す吸熱温度を組成に対して示した。GS 自身は 20—110°C の温度範囲では何ら吸発熱を示さない。従ってこれ等の吸発熱はいずれも、膜中で DPPC の炭化水素によって形成される疎水性領域の融解に基づくものと考えられる。42°C に見い出される吸発熱は明らかに DPPC 固有の相転移を示すものである。GS は $X_{GS} \approx 0.18$ まで DPPC 相中に溶解するが、転移点はこれによってあまり変化せず、42°C からやや低下して 40°C となる。この相を Fig. 3 では S_h とした。 X_{GS} が 0.18 を越えると GS は S_h 相中に溶解しきれなくなり、新しい相が析出する。この相 (S_1) は 35°C 付近にて相変化を示した。GS 添加量が増加するにつれて S_h 相が減少し、 S_1 相が増加する様子は Fig. 2 に示されている。Fig. 3 の a—d の組成の混合物は昇温の時も降温の時もそれぞれ 35°C と 40°C 付近に 2 つの相変化を示したが、これはゲル相 (S) のみならず液晶相 (LC) においても DPPC と GS が混じり合わず、 LC_h 相と LC_1 相が共存するためである。line def. で示される組成 (Fig. 2 より求めた) にて $S_h \leftrightarrow LC_h$ の相変化を示すピークは消失し、 S_1 や LC_1 相のみが残る。点 d より X_{GS} が大きい領域では S_1 相に GS が混合してくる。点 e によって示されるように、 $S_1 \leftrightarrow LC_1$ の相転移温度が昇温と降温で変わらない事や、a—d の組成において $S_1 \leftrightarrow LC_1$ の相転移温度が一定であるということは、これ等の相が DPPC と GS の混合物で形成されるにもかかわらず、 S_1 相と LC_1 相の組成が等しく、あたかも単一成分のような挙動を示す事を表わしている。これは S_1 相や LC_1 相が GS と DPPC の 2 次元格子複合体によって形成されている相である事を示唆する。この事については後にも述べる。

GS は環状のポリペプチドで、その親水基を環の内側に、疎水基を外側に向けたコンパクトな構造を持っており、全体としては疎水性の高い物質である⁴⁾。疎水性の強い蛋白やポリペプチドが脂質膜と相互作用すると、一般にその周辺に脂質があたかも溶媒和した様に結合し、これとその他の脂質が 2 次元の溶液を形成すると考えられている。この時、蛋白やポリペプチドと直接に相互作用している脂質は、それ以外の脂質とは異なる性質を有すると考えられている。⁵⁾ GS-DPPC 系においても、このような相互作用に関与する脂質の疎水基部分はより低

温でとける事がわかる。Fig. 3 はまた、DPPC と GS により形成される膜系の相図でもあり、例えば、 $S_h + S_l$ で示される領域にて DPPC 濃厚相 (S_h) と GS 組成の大きい相 (S_l) が共存する事を示している。

GS と DPPC の混合系に対する DSC の測定は一部分、W. Pache ら⁶⁾ および E. Wu ら⁴⁾ によってなされたが、これ等の場合、GS のモル分率 0.2—0.5 の間の測定がなされていない。この結果、DSC チャート上では単一のピークしか見い出せず、*L*- α -dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) と GS 混合系が 2 本のピークを呈する事と著しく異なると論ぜられていた。⁴⁾ 本研究の結果から判断すると DMPC-GS 系と DPPC-GS 系には本質的な差異がない事がわかる。すなわち、GS は DMPC 膜中と同様、DPPC 膜中にも取り込まれると考えられる。より最近の Laser-Raman スペクトルによる研究から、GS の添加がゲル状態の DMPC 膜中での脂質の炭化水素鎖の運動性を著しく高めるとい事が報告されている。⁷⁾ 我々は DPPC-GS 系 (GS のモル分率: 0.37) の重水中における NMR の測定を行ない、親水基中の *N*-methyl 基においても、疎水基中の methyl 基や methylene 基においても、プロトンの共鳴幅が著しくせばまる事を見出した。⁸⁾ NMR の線幅は脂質の炭化水素鎖の C-C や C-H 結合の回転に強く依存するが、この測定結果より GS の添加が脂質の分子内運動を増大させる事がわかる。リン脂質分子が配向して膜状になっている時、その疎水基間にも親水基間にも強い分子間力が働いているが、⁹⁾ GS と膜の相互作用はこの脂質の配向性を弱めるのであろう。GS と脂質との相互作用はこの結果、膜の透過性を著しく増大させる¹⁰⁾ と考えられる。また、 $S_h \leftrightarrow LC_h$ に比べ、 $S_l \leftrightarrow LC_l$ の相転移点が低いのもこの事に関係すると考えられる。

このような環状ポリペプチド GS の脂質膜に対する作用は、同じ *Bacillus brevis* より産出される直鎖ポリペプチド gramicidin A が脂質膜の分子配向の規則性を高め、膜を“堅くする”という作用と対照的である。^{20, 6)}

GS と phosphatidylethanolamine の相互作用については、今までほとんど検討されていない。Fig. 6 より明らかなように GS-DPPE 系でも GS-DPPC 系によく似た相化学的結果が得られた。DPPC は中性であるが DPPE は弱酸性である。また GS はその ornithine 残基の存在により、弱塩基性とも言える。GS-DPPE 系を GS-DPPC 系と比較すると Fig. 6, Fig. 3 から明らかなように、前者では GS 組成のより低い所で、GS と DPPE の複合体相の相転移 ($S_l' \leftrightarrow LC_l'$) に対応する吸熱ピークがあらわれ、 $X_{GS} = 0.18 - 0.2$ 付近で DPPE 固有の相転移点 ($S_h' \leftrightarrow LC_h'$) が見い出されなくなる。これより、複合体は GS 1 分子と約 4 分子の DPPE により形成されている (GS-DPPC の場合は GS 1 分子につき DPPC 約 2 分子) と考えられる。また、DPPE 膜自身の相転移点も Fig. 6 の $S_h' \leftrightarrow LC_h'$ を示す line が示すように X_{GS} に強く依存するが、これは DPPE と GS 分子間の静電力が関係しているとも考えられる。

脂質混合系に対する GS の効果

Fig. 7 の DPPC-DPPE 混合系の相転移点と組成の関係は、この系の相図とみなすことができる。すなわち、 S , $S + LC$, LC で示した領域ではそれぞれ、ゲル状態 (S)、ゲル状態 (S) と液晶状態 (LC)、および液晶状態 (LC) の脂質混合膜が存在すると考えられる。この結果は、ラマンスペクトル、ESR スペクトルや熱分析によって得られている文献値とほぼ一致した。¹¹⁾ S 状態においては DPPC と DPPE の混合性は理想性から大きくずれ、DPPE 組成の低い所では相分離の可能性もある事もわかる。Fig. 8 に混合膜に対する GS の効果を示した。GS のモル分率は Fig. 3 や Fig. 6 の点 d におけるモル分率より大きい 0.41—0.49 であり、この組成において全ての脂質はポリペプチドとの複合体形成に費やされている。脂質中の DPPC 組成が高い領域では、複合体により形成される相は、昇温時も降温時も一定のゲル (S_l) $\leftrightarrow$ 液晶 (LC_l) 相転移点を 35°C に有した。本文で述べる複合体とは、DSC 測定からも明らかなように、明確な相としての性質を有する膜状の格子複合体相と考えられる。上の結果は、この相が DPPE の混入にもかかわらず協同性 (cooperativity) の高い相転移をすることを意味する。しかもこの転移点は、DPPE の添加によらず一定であった。これは、この相を形成する複合体の基本構造が GS と DPPC によって形成され、この構造中の DPPC が一部 DPPE に置換されても全体的な格子構造にはあまり影響を与えず、協同性の高い相転移現象が維持されるためと考えられる。DPPE 組成の高い領域においては逆に、DPPC の添加によらず協同性の高い $S_l' \leftrightarrow LC_l'$ 相転移を示す。これも、相を形成する複合体の基本骨格が GS と DPPE によって形成され、構造中の一部の DPPE が DPPC に置換されてもあまり協同効果に影響を与えないためと考えられるが、相転移点は DPPC による置換によって低温側に移る事がわかる。脂質の組成が中間付近の領域において測定値の再現性が良くなかったりするのは、 S_l と S_l' 、あるいは LC_l と LC_l' が互い

に相入れない構造であるためと考えられる。この領域で相転移点は不連続に変化する。

GS と脂質膜の相互作用について

以上の考察より、次の事が明らかになった。

1) GS は DPPC, DPPE, さらにこれらの混合膜に添加されると、脂質と結合し、協同性の強い複合体相を形成する。

2) これらの複合体相中の脂質は、遊離状態より低温側で疎水性部分の融解を行ない、ゲル状態でもより高い分子内運動性を持っている。

実 験¹²⁾

DPPC ($L\text{-}\alpha$ -dipalmitoylphosphatidylcholine), DPPE ($L\text{-}\alpha$ -dipalmitoylphosphatidylethanolamine), gramicidin S 塩酸塩は、いずれも Sigma 社製のものをを用いた。

試料の調製に際しては、単一脂質系、混合脂質系、脂質-gramicidin S 混合系いずれの場合にも、試料を径 5 mm 深さ 1.5 mm のアルミ製開放容器に 2—10 mg 秤取し、次いでこれを 60°C の水浴上でクロロホルム-酢酸混液にとかした。室温で風乾して溶媒がほぼなくなったら、アブデルハルデン氏式乾燥器に入れ、60°C 減圧乾燥後、減圧で一昼夜放置した。乾燥し終わったら、これに蒸留水 2—3 滴を加え、60°C の水浴上でピンでかきまぜて、均一に膨潤させた。これにアルミニウム製の落とし蓋をして測定に供した。GS に対する脂質の組成が高い時は 3—4 回の昇降温をくり返しても共存する自由水が減少するだけで結合水は変化しない。すなわちラメラ相の相化学的性質も変化しない。また、この時の吸発熱量も変化しないことが実験的に解っている。¹²⁾一方、GS の組成が高く水が蒸発しやすい場合には、開放容器でなく密閉容器を用いた。

示差走査熱量分析 (DSC) には、島津の示差走査熱量計 DSC-30 を使用した。DSC の感度は range 25 または range 10, 昇温降温速度は 5°C/min で測定した。相変化温度は前報同様に melting または freezing の開始点を外挿法により求めた。¹²⁾

ピーク面積の測定に関しては、チャートを厚紙に書き写し、それを切り取って重量を測定した。

引用文献および注

- 1) M. Glaser, S.J. Singer, *Biochemistry*, **10**, 1780 (1971); *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **56**, 1828 (1966); D.F.H. Wallach, P.H. Zahler, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **56**, 1552 (1966); G.B. Birrell, O.H. Griffith, *Biochemistry*, **15**, 2925 (1976); G.G. Hammes, S.E. Shullery, *Biochemistry*, **9**, 2555 (1970).
- 2) a) P. Mueller, D.O. Rudin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **26**, 398 (1967); E. Neher, H. Eibl, *Biochem. Biophys. Acta*, **464**, 37 (1977); D. Chapman, J. Urbina, K.M. Keough, *J. Biol. Chem.*, **249**, 2512 (1974); D. Rice, E. Oldfield, *Biochemistry*, **18**, 3272 (1979); b) E.G. Finer, H. Hauser, D. Chapman, *Chem. Phys. Lipids*, **3**, 386 (1969).
- 3) 加藤哲夫, 泉屋信夫, 蛋白質・核酸・酵素, **15**, 842 (1970).
- 4) E. Wu, K. Jacobson, F. Szoka, A. Portis, Jr., *Biochemistry*, **17**, 5543 (1978).
- 5) S.J. Singer, G.N.icolson, *Science*, **175**, 720 (1972); P.C. Jost, O.H. Griffith, R.A. Capaldi, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 480 (1973); D. Papahadjopoulos, *J. Colloid Interface Sci.*, **58**, 459 (1977).
- 6) W. Pache, D. Chapman, R. Hillaby, *Biochem. Biophys. Acta*, **255**, 358 (1972).
- 7) H.Susi, J. Sampugna, J.W. Hampson, J.S. Ard, *Biochemistry*, **18**, 297 (1979).
- 8) 中垣正幸, 半田哲郎, 瀬原千華子, 日本薬学会第 99 年年会, 札幌, 1979 年 8 月,
- 9) B.A. Pethica, *J.C.S. Faraday*, **72**, 2685 (1976).
- 10) D.S. Cafiso, W.L. Hubbell, *Biochemistry*, **17**, 187 (1978).
- 11) R. Mendelsohn, C. Koch, *Biochem. Biophys. Acta*, **598**, 260 (1980); E.J. Shimshick, H.M. McConnell, *Biochemistry*, **12**, 2351 (1973); A. Blume, T. Ackerman, *FEBS Lett.*, **43**, 71 (1974).
- 12) 中垣正幸, 半田哲郎, 大橋佳代子, 薬誌, **99**, 1 (1979); **99**, 564 (1979).