

ウシラクトフェリシンと酸性リン脂質二重膜との特異的相互作用解析およびその抗菌作用の解明

誌名	ミルクサイエンス = Milk science
ISSN	13430289
著者	梅山, 万左子 西村, 勝之 内藤, 品
巻/号	53巻4号
掲載ページ	p. 280-281
発行年月	2004年12月

ウシラクトフェリシンと酸性リン脂質二重膜との特異的相互作用解析 およびその抗菌作用の解明

梅山万左子・西村勝之・内藤 晶
(横浜国大・院工・機能発現工学)

Specific Interaction of Bovine Lactoferricin with Acidic Phospholipid Bilayers and Elucidation of its Antimicrobial Activity

Masako Umeyama, Katsuyuki Nishimura, Akira Naito

(Division of Materials Science and Chemical Engineering, Graduate School of Engineering, Yokohama
National University, 79-5 Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama 2408501 JAPAN)

序 論

ウシラクトフェリシンの消化によって生成されるウシラクトフェリシン (LfcinB) は25アミノ酸残基 (LfcinB-25) からなる抗菌ペプチドである。一次構造 Phe-Lys-Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Pro-Ser-Ile-Thr-Cys-Val-Arg-Arg-Ala-Phe において、Cys³ と Cys²⁰ で S-S 結合をつくり環状構造を形成している。LfcinB の抗菌活性を示す最小単位は Arg⁴-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg⁹-NH₂ (LfcinB-6) であることが知られている。本研究では、抗菌ペプチドは特定の細菌の膜に対して特異性をもつと考えられることから、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の細胞膜のリン脂質組成を参考にした DMPG65%, CL10%, DMPC25%の重量百分率からなる混合膜を用い、この膜と LfcinB-25 および LfcinB-6 のそれぞれとの特異的相互作用を解析し、抗菌作用の分子機構を明らかにすることを目的とした。

実 験

LfcinB-25 と LfcinB-6 を固相法により Fmoc アミノ酸を用いて化学合成した。レジンの切り出しとアミノ酸残基の保護基の脱保護を行って得た粗製試料を逆相 HPLC により精製した。LfcinB-25 (還元型) については、空気酸化により分子内 S-S 結合を形成して LfcinB-25 (酸化型) を生成し、逆相 HPLC を用いて精製した。目的のペプチドが得られたことを質量分析法により確認した。次に、固体 NMR 測定試料として LfcinB-25 と LfcinB-6 をそれぞれ DMPG65%, CL10%, DMPC25% の重量百分率の脂質からなる混合膜(I)および DMPC 膜(II)に再構成した。pH 7.5, 100 mM NaCl, 20 mM Tris 緩

衝液を用いて水和・膨潤、凍結融解を行って多重膜小胞 (MLV) を形成し、さらに重水素を加えて凍結乾燥を2回繰返して重水素置換を行った。³¹P static, ¹³C DD-MAS, ¹H MAS NMR スペクトルを液晶相温度およびゲル相温度で測定した。さらに、pH 7.5, 100 mM KCl, 20 mM Tris 緩衝液を用いてカリウムイオンを内側に含む一重膜小胞 (LUV) を形成し、LUV に LfcinB を加えることにより生じるカリウムイオンの透過を、カリウムイオン選択性電極を用いて LUV 外側のカリウムイオン濃度変化から測定した。

結果と考察

LfcinB を混合膜と DMPC 膜に添加して ³¹P static NMR スペクトルの線形変化を測定したところ、混合膜の方が大きな変化を示したので LfcinB は DMPC 膜より混合膜に特異的相互作用をもつことがわかった (図 1)。これは混合膜中の酸性脂質と LfcinB の塩基性アミノ酸側鎖との間の静電的相互作用によると考えられる。さらに LfcinB-25 および LfcinB-6-混合膜系では液晶相温度で ³¹P static NMR スペクトルに等方成分が 0 ppm 付近に観測された。この結果は LfcinB の作用により二重膜に欠陥が生じた可能性を示唆している。リン脂質の ¹³C DD-MAS NMR 測定結果から LfcinB の添加によりリン脂質二重膜のグリセロールの C α 部位の信号がシフトしたので、この部位と特異的に相互作用をしたことが示唆された (表 1)。リン脂質の ¹H MAS NMR 測定結果から Trp の環電流効果による化学シフト値の変化を観測できた。リン脂質のグリセロール基の CH (β) のみが低磁場シフトをしたことから Trp 残基が二重膜の界面に存在する可能性があることが示唆された (表 2)。これらの結果は、リン脂質二重膜の親水性基と疎水性基の界面に Trp を含む LfcinB の塩基性部位 (LfcinB-6)

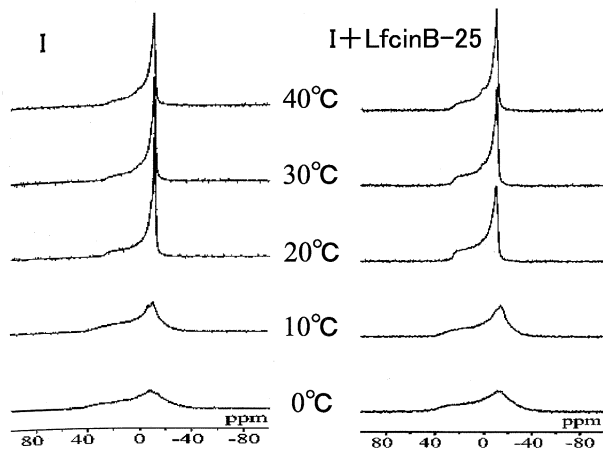


Fig. 1 Temperature variation of ³¹P NMR spectra of LfcinB-acidic phospholipids bilayer systems. (peptide : lipid = 1 : 20)

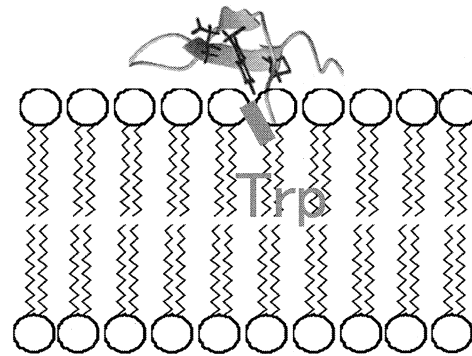


Fig. 2 Schematic representation of the location of LfcinB-25 on the lipid bilayers. Trp residues are located in the interfacial region. The structure of LfcinB-25 is reported in Peter M. Hwang et al., *Biochemistry* 37, 4288-4298 (1998).

Table 1 ¹³C chemical shift values for the peaks with significant shifts in LfcinB-acidic phospholipids bilayer systems at 40°C.

	Chemical shifts (ppm from TMS)*		
Acidic bilayer (I)	59.83	60.32	60.70
I+LfcinB-25	59.91	60.14	60.36
I+LfcinB-6	59.90	60.17	60.31

*These three signals are corresponding to either DMPC (C α), DMPG (C α) or Tris.

Table 2 ¹H chemical shift values for the peaks with significant shifts in LfcinB-acidic phospholipids bilayer systems at 40°C.

	Chemical shifts (ppm from TMS)
Acidic bilayer (I)	3.787
I+LfcinB-25	3.803
I+LfcinB-6	3.800

が局在していることを示している (図2)。さらにリン脂質二重膜に LfcinB-25を添加すると直ちに凝集したことが光学顕微鏡により観察された。この結果は塩基性部位 (LfcinB-6) で細菌のモデル膜と静電的相互作用をするが, Trp が界面に存在するために膜の外側に現れた

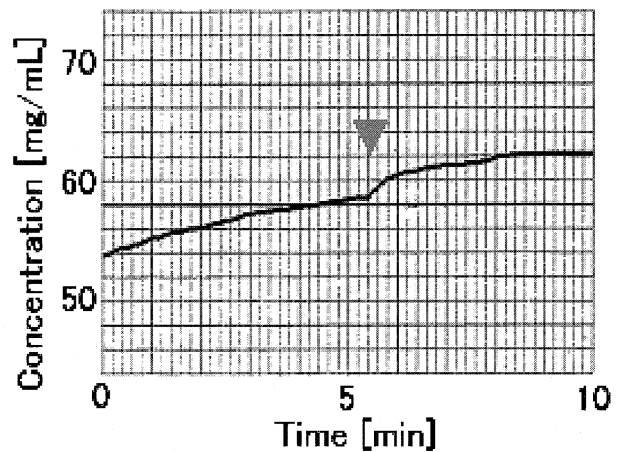


Fig. 3 Time course of concentration variation of K⁺ after adding LfcinB-25 (1 mM, 100 μ L) at arrow position to acidic phospholipids bilayers.

疎水性基の疎水性相互作用により膜同士が凝集したものと考えられる。カリウムイオン透過実験から, LfcinB の作用によるカリウムイオンの膜透過が確認できた (図3)。以上の結果は, LfcinB は細菌の細胞膜と特異的に相互作用をし, 孔を形成する欠陥が生じてイオン透過を促進することを示している。このため, 細胞膜内外のイオンの濃度勾配を保てなくなり抗菌作用が発現する分子機構が明らかになった。