

Direct Interaction between Amphotericin B and Ergosterol in Lipid Bilayers As Revealed by ^2H NMR Spectroscopy

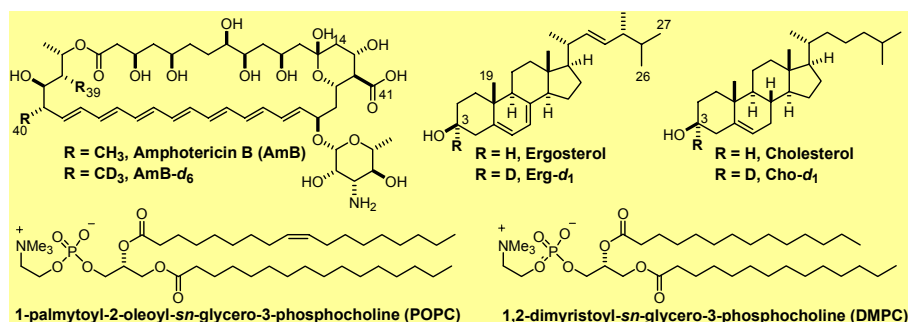
Nobuaki Matsumori,* Kazuaki Tahara, Hiroko Yamamoto, Atsushi Morooka, Mototsugu Doi, Tohru Oishi, and Michio Murata*

J. AM. CHEM. SOC. 2009, 131, 11855–11860

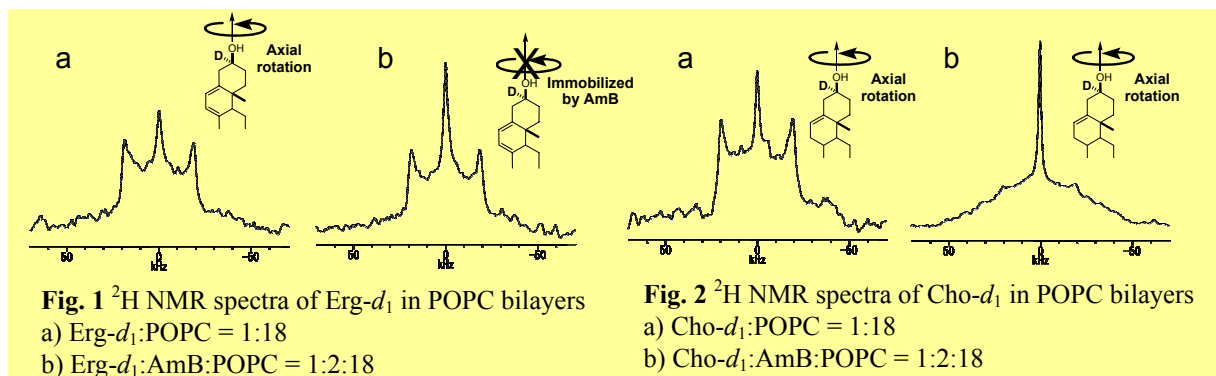
Although amphotericin B (AmB) is thought to exert its antifungal activity by forming ion-channel together with ergosterol, no previous study has directly proven the AmB-ergosterol interaction. To establish the interaction, we measured solid-state ^2H NMR using deuterated sterols and AmB. The spectra showed that fast axial rotation of ergosterol was inhibited by the coexistence of AmB, whereas that of cholesterol was essentially unchanged by AmB, thus demonstrating that ergosterol has significant interaction with AmB. This is the first direct observation of AmB-ergosterol interaction in lipid bilayers.

ポリエチレンマクロライド系抗生物質アンフォテリシンB (AmB) は、脂質膜中でイオン透過性チャンネル複合体を形成し、抗真菌活性を発揮する。AmBはステロールと相互作用してチャンネル複合体を形成すると考えられており、その選択毒性は、ヒト細胞膜に含まれるコレステロールに比べて、真菌細胞膜に含まれるエルゴステロールに対する親和性の高さに起因するとされている。しかし、AmBとステロールの分子間相互作用を直接観測した研究はまだない。そこで我々はまず重水素標識したステロール

(Erg- d_1 , Cho- d_1) および AmB (AmB- d_6) を調製し、重水素固体NMRを用いて脂質二重膜中におけるステロールおよびAmBの運動性を評価した¹⁾。



Cho- d_1 およびErg- d_1 は化学合成によって調製した。これらの重水素化ステロールを用いて、不飽和リン脂質であるPOPC (palmitoyl-oleoylphosphatidylcholine) 膜中における ^2H NMRを測定した。Erg- d_1 は粉末状態で114 kHz程度の四極子分裂を示すが、POPC膜中では高速で軸回転運動をしているため、Fig.1aのように分裂幅が39 kHz程度になる。次にAmB含有POPC膜でErg- d_1 の ^2H NMRを測定すると、Fig.1bに示すようにシグナルが顕著にブロードニングした。これはAmBとの相互作用によってエルゴステロールの回転運動が阻害されたためと考えられる。Cho- d_1 を用いて同様の測定を行ったが、AmBを共存させても運動性の低下がみられなかったことから(Fig.2)、コレステロールはAmBとほとんど相互作用していないことが確認された。



また、AmB生産菌に3- d_3 プロピオン酸ナトリウムを取り込ませて生合成的に調製したAmB- d_6 を用いて、POPC膜中におけるAmBの運動性についても検討した。その結果、AmBは膜中でほぼ静止しているが、エルゴステロール含有膜ではAmBの運動性が増加することが明らかとなった。つまり、AmBとエルゴステロールが共存すると、両者の運動性が近くなることが示された。このように、 ^2H NMRを用いてAmBとエルゴステロールが直接相互作用していることを初めて実験的に示すことができた。

一方、脂質膜を不飽和リン脂質のPOPCから飽和リン脂質DMPC (dimyristoyl phosphatidylcholine) に変えて ^2H NMRを測定すると、AmBとエルゴステロールの相互作用がほとんど検出されなかった。これは、AmBとDMPC間の相互作用が強いため、AmB-エルゴステロール相互作用が相対的に弱められたためと考えられる。このように、AmBとステロール間の相互作用はリン脂質の種類に依存することも明らかとなった。このように、AmBとエルゴステロールの分子間相互作用を ^2H NMRを用いて直接観測することに初めて成功した。

References

- 1) Matsumori N. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11855.