

糖類縁体導入リポソームに対する エンドソーム pH 選択的膜融合系の構築

日大生産工 (院) ○坪井 茉奈
日大生産工 柏田 歩・松田 清美

【緒言】

薬物や遺伝子を生体内に投与する際、これらの物質のより高い効能や効果を生体にもたすために、病巣となる標的細胞内へ直接的に送り込む技術が求められている。一方、生体内では膜融合を通じて高効率な情報や物質の伝達を標的選択的に行っている。その例として、インフルエンザウイルスは、標的細胞表層に存在する糖鎖(シアル酸部位)に対し選択的分子認識を行った後、エンドソーム環境下において膜融合することにより、標的細胞へ遺伝情報を伝達し、感染をもたらすことが知られている¹⁾。そこで、このような天然の膜融合系を模倣した系の構築を行うことにより、標的選択的な薬物や遺伝子送達システム構築の可能性を広げることができると考えられる。

我々の研究においては、まず人工的な膜融合モデル系構築を行うにあたり、細胞表面に広く存在し、種々の生体内反応への寄与が知られているホスファチジルイノシトール(PI)を導入したリポソームを標的として用いた。そして、PI 導入リポソームに対し、分子認識を駆動力とした標的選択的かつ pH 選択的な膜融合を行う担体リポソームの設計を試みた。

これまでに、標的リポソームに導入した PI 上の環状 *cys*-ジオール構造を選択的に認識することが知られているフェニルボロン酸誘導体を担体リポソームに導入することにより、リポソーム界面における選択的分子認識を駆動力とした膜融合を塩基性条件において実現している²⁾。また、ボロン酸のホウ素原子近隣に三級アミンを配置した新たな誘導体 BA(Fig. 1)を導入した担体リポソームを用いることにより、塩基性から弱酸性まで広範囲の pH 領域において分子認識を駆動力とした膜融合系を構築することに成功している³⁾。

そこでさらに、エンドソーム pH においてのみ標的選択的な膜融合を実現することができれば、細胞内のエンドソーム環境下における膜融合に伴い、目的となる組織、核に対し、薬物や遺伝子を直接的に送達するシステム構築への寄与が期待される。本報告では、担体-標的リポソーム間での分子認識をリポソーム表面電荷で制御することにより、糖類縁体導入リポソームに対するエンドソーム pH 選択的な膜融合挙動を示す系の構築を試みた。

【実験】

リポソーム溶液は脂質濃度 2.0 mM で調製した。なお、電荷制御のための弱酸性脂質としてジパルミトイルグリセロスクシネート(DPGS)を用いた。担体(EggPC/BA/DPGS(90/5/5))、および標的リポソーム (EggPC/PI(95/5))はそれぞれクロロホルムに溶解後、溶媒留去することでそれぞれ薄膜を作製し、緩衝液中 45 °C で 30 分間水和させた。そしてボルテックスミキサーで攪拌し脂質懸濁液を得た後、5 回凍結融解し、エクストルージョン法により直径 100 nm の一枚膜リポソーム (Small unilamellar vesicle; SUV)の調製を行った。

なお、膜融合挙動については、リポソームサイズ変化を動的光散乱(DLS)測定、また担体-標的リポソーム間の脂質混合を FRET 現象を利用した蛍光測定によりそれぞれ評価した。

【結果・考察】

これまで、BA を担体リポソームに導入するこ

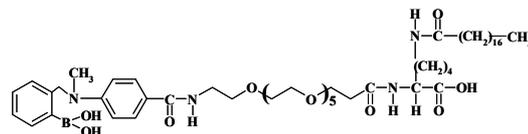


Fig. 1 Structure of the boronic acid derivative (BA) for membrane fusion system in this study.

Construction of Endosomal pH-Responsive Membrane Fusion System toward
Sugar-Like Compound Containing Liposomal Vesicles

Mana TSUBOI, Ayumi KASHIWADA and Kiyomi MATSUDA

とにより, PI を導入した標的リポソームに対し, pH 5.0 から pH 10.5 まで幅広い pH 範囲において膜融合を達成した³⁾.

本報告では, 塩基性および中性条件下での担体-標的リポソーム表面における分子認識を阻害することにより, エンドソーム環境に匹敵する弱酸性 pH 選択的な膜融合系の構築を試みた. 本系における標的リポソームは, PI の負電荷により全体的に負に帯電している. そこで, 担体リポソームに弱酸性のカルボキシル基を有する脂質である DPGS を導入した. これにより, 塩基性および中性条件下ではカルボキシル基の解離により担体-標的リポソーム間に静電反発が生じることから, リポソーム界面における分子認識が阻害され, 膜融合挙動を示さないことが予想される. 一方, 弱酸性条件下ではカルボキシル基の解離が抑制されるため, 担体-標的リポソーム間の静電反発が緩和され, ボロン酸によるジオール認識に伴い, 膜融合することが期待される. このように Fig. 1 に示したボロン酸誘導体による標的のジオール認識に加え, DPGS と PI による静電相互作用を利用したリポソーム界面の制御により, 弱酸性 pH 選択的な膜融合挙動を示す系の構築を行った.

担体側に BA および DPGS, 標的側に PI をそれぞれ導入した SUV を調製し, 両者を混合した際の膜融合の評価を行った. はじめに, DLS 測定により融合に伴うリポソームのサイズ変化に関して検討を行った結果, 弱酸性条件(pH 5.0)下では混合直後, 融合に伴うリポソーム界面の乱れにより見かけ上の顕著なリポソームサイズの増大が観測された(Fig. 2). 一方, 中性条件(pH 7.5)においてリポソームサイズの変化は観測されなかった. また, FRET を利用した蛍光測定による脂質混合実験を行った結果においても, 弱酸性条件において, 担体-標的リポソーム間における脂質混合が観測された(Fig. 3). この結果は, DLS 測定と矛盾しないものであった. さらに, 脂質混合の pH 依存実験を行った結果, 弱酸性条件においてのみ脂質混合が観測されたことから, 担体および標的リポソーム上での分子認識に加え, リポソーム界面の電荷制御により, 期待通りエンドソーム pH でのみ膜融合挙動を示す系を構築できたこ

とが示された.

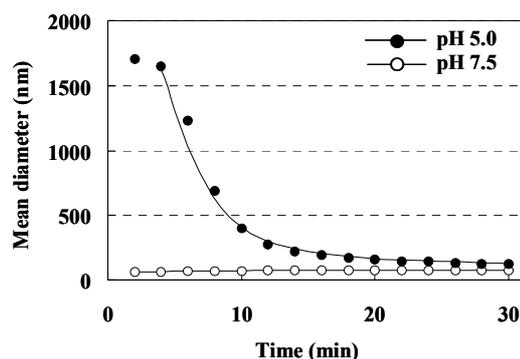


Fig. 2 Time course for the variation in the size of mixture of the donor and the target vesicles. The measurements were performed in 10 mM acetic acid/sodium acetate buffer (pH 5.0) or tricine buffer (pH 7.5) containing 100 mM sodium chloride at 30 °C.

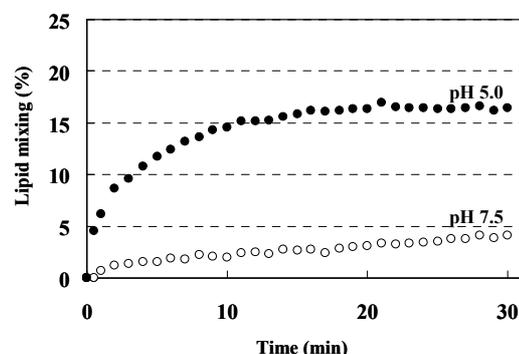


Fig. 3 FRET experiments for measuring lipid mixing. The fluorophores containing target vesicles were mixed with the donor vesicles. The measurements were performed in 10 mM acetic acid/sodium acetate buffer (pH 5.0) or tricine buffer (pH 7.5) containing 100 mM sodium chloride at 30 °C.

【結言】

本研究において, 糖類縁体導入リポソームに対するエンドソーム pH 選択的な膜融合系が構築できたことから, 今後, より適切な標的の検討および担体の設計を含めた膜融合系の構築を行うことで, ある決まった標的細胞選択的な薬物や遺伝子送達システム構築への貢献が期待される.

【参考文献】

- 1) C. M. Carr, P. S. Kim, *Cell* **73**, (1993) 823-832.
- 2) A. Kashiwada, M. Tsuboi, K. Matsuda, *Chem. Commun.* **2009**, 695-697.
- 3) A. Kashiwada, M. Tsuboi, T. Mizuno, T. Nagasaki, K. Matsuda, *Soft Matter*, **2009**, in press.