

金属イオン駆動型リポソーム膜融合系の設計

日大生産工(院) ○佐原 弘太郎 日大生産工 柏田 歩

1 緒言

リポソームは生体膜と同様のリン脂質で構成された脂質二重膜構造からなる両親媒性の閉鎖小胞であり、その生体適合性の高さから薬物送達システム(DDS)のための担体や人工細胞膜モデルとして利用されている。

リポソームを構成するリン脂質中のリン酸基は金属イオンと親和性が高く、特に、ジルコニウムのような四価金属イオンがリン酸基との錯形成に有効であることが知られている^{1,2)}。

このようなリン酸基またはカルボニル基に対する錯形成を利用したリポソーム間の接近や金属イオンのようなカチオン性因子とリン脂質との間の静電的相互作用を駆動力としたリポソーム間の接近のような金属イオン－リポソーム間の相互作用は標的成分となる細胞に対し、選択的に相互作用し、膜融合を利用した送達という点で DDS 開発に貢献できると考える。

金属イオンをリポソーム間の接近を駆動力とした本実験系において、リポソームの形状変化を Figure 1 に示す。

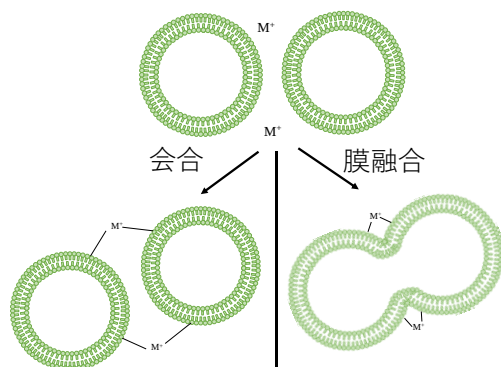


Figure 1 Association or fusion of liposomes triggered by metal ions.

本系では膜融合またはリポソーム間の接近のみに起因した会合および凝集が考えられる。そのため、本研究では、金属イオンによって起きるリポソームの形態変化が膜融合に由来するものであるのか、それとも会合および凝集に由来するものであるかについて評価を行った。

また、金属イオンとしてリン酸基と親和性が高いと予想される Zr^{4+} および Ca^{2+} イオンの添加によるリポソームに対する影響の評価することにより、リポソームを構成するリン脂質中のリン酸基またはカルボニル基に対する種々金属イオンによる錯形成および静電的相互作用にもとづく膜融合系の設計を行った。

2 実験

本研究で用いたリポソームは中性リン脂質である $\text{L-}\alpha\text{-phosphatidylcholine}$ (Egg-PC)およびアニオン性リン脂質である $\text{L-}\alpha\text{-phosphatidylglycerol}$ (Egg-PG)を基本脂質としてエクストルージョン法により 100 nm の単層リポソームとして調製した。

金属イオン添加によるリポソームの膜融合あるいは会合挙動の評価は 2 種類の蛍光色素 NBD およびローダミン(Rh)間の蛍光共鳴エネルギー移動を利用したリポソーム間の脂質混合実験および動的光散乱測定(DLS)を用いたリポソーム粒径の変化に基づき行った。なお、添加する金属イオンは Zr^{4+} および Ca^{2+} とし、その濃度はリポソーム構成脂質濃度に対して 0 ～ 60 mol%とした。

3 実験結果および考察

Zr^{4+} および Ca^{2+} イオン添加におけるリポソームの粒径変化について Figure 2 に示す。

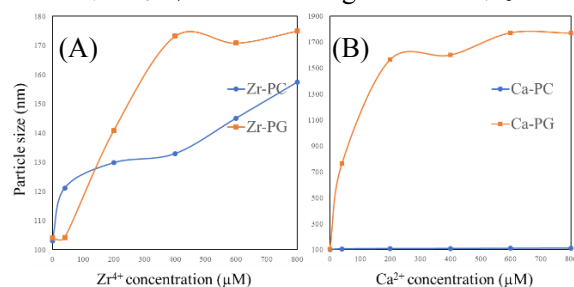


Figure 2 Change in particle size of Egg-PC and Egg-PG liposome in the presence of Zr^{4+} ions (A) or Ca^{2+} ions (B).

Zr^{4+} イオンの添加により中性リン脂質である Egg-PC により構成されたリポソームでは最大で約 1.5 倍の平均粒径増大が観測され、アニオン性リン脂質である Egg-PG により構成されたリポソームでは最大で約 1.7 倍の平均粒径増大が観測された。また、 Ca^{2+} イオンの添加により Egg-PC リポソームでは最大で約 1.1 倍の平均粒径増大が観測されたのに対し、Egg-PG リポソームでは最大で約 17 倍もの平均粒径増大が観測された。これらの結果は Zr^{4+} イオン添加時にリポソーム構成脂質の電荷に関わらずリン酸基を介したリポソーム膜融合が起きていることを示している。一方、 Ca^{2+} イオンにおいて、アニオン性の Egg-PG から構成されたリポソームにおいてのみリポソームの会合または凝集に起因するような粒径の急激な増大が観測された。このような結果から Ca^{2+} イオンはアニオン性リポソーム同士のバインダーとして働き、リポソームの会合および凝集が起きていることが考えられる。

また、金属イオン添加によるリポソーム間の膜融合を評価するため、蛍光測定による脂質混合挙動の確認を行った。しかし、全ての条件において脂質混合による蛍光変化は示さず、リポソーム間の会合または凝集に起因するような蛍光強度の減少のみが観測された。この結果から、本系においては期待したリポソーム間の膜

融合が起きている可能性が低いことが考えられた。

4 まとめ

本研究では金属イオンを駆動力としたリポソーム膜融合系の評価を行った。

実験結果から Ca^{2+} イオンではリポソームの膜融合を制御することは困難であり、また、会合および凝集現象が引き起こされ巨大なクラスターを形成すると考えられる。

一方、 Zr^{4+} イオンでは中性電荷および負電荷リポソームの双方で膜融合と思われるリポソーム粒径変化を示した。しかし、このような挙動がリポソームを構成するリン脂質のどの部位に起因した相互作用にもとづくものであるかに関しては不明瞭である。そして、このような挙動が膜融合ではなくリポソーム間の会合によるものである可能性は完全に否定することができない。さらに、リポソーム間の脂質混合挙動による膜融合評価を行ったところ、会合に起因することを示す結果が得られた。

今後の研究においては、金属イオン添加後にリポソームが会合していることを仮定して、系中の金属イオンを除去することによる、リポソームの形状変化について評価を行っていく。そして、詳細な検討を行った上で金属イオン駆動型のリポソーム膜融合系の設計について研究を進めていく。

5 参考文献

- 1) S. C. Bugel, O. Guillaume-Gentil, L. Zheng, J. Voros, M. Bally, *Langmuir*, 2010, **26**, 10995-11002.
- 2) A. Melcrova, S. Pokorna, S. Pullanchery, M. Kohagen, P. Jurkiewicz, M. Hof, P. S. Cremer, L. Cwiklik, *Nature Scientific Reports*, 2016, **6**, 38035.