

## 金属イオン-リン脂質間における錯形成を駆動力としたリポソーム膜融合系の評価

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<sup>1,2)</sup>。

このような金属イオンの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結合やカチオンとしての金属イオンとアニオンとしての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結合のような金属イオン-リポソーム間相互作用は標的となる細胞に対し, 選択的に相互作用し, 膜融合を利用した物質送達という点で DDS 開発に貢献できると考えられる。

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ける, リポソームの形態変化の様式図を Figure 1 に示す。

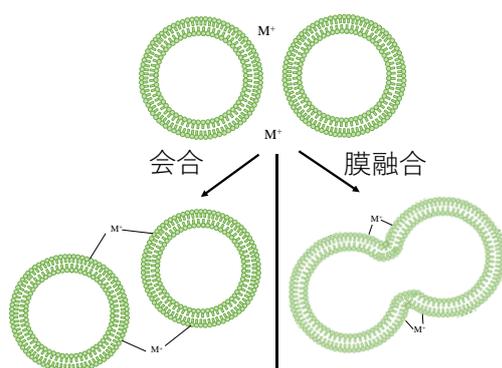


Figure 1 Association or fusion of liposomes triggered by metal ions.

本系では膜融合またはリポソーム間の結合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誘導されるリポソームの形態変化が膜融合に由来するものか, それとも会合および凝集に由来するもの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  $Zr^{4+}$  をはじめとする種々の金属イオン添加によるリポソームの形態変化に対する影響を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やその他の官能基に対する種々の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 L- $\alpha$ -phosphatidylcholine(EggPC)を基本脂質として種々の脂質と混合したものを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。

金属イオン存在下におけるによるリポソームの膜融合あるいは会合挙動は 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(DLS)測定を用いたリポソーム粒径の変化に基づき評価した。なお, 添加する金属イオン濃度はリポソーム構成脂質濃度に対して 0 ~ 80 mol%とした。

Characterization of liposomal membrane fusion behavior triggered by complex formation between metal ions and phosphate group in phospholipids.

Kotaro SAHARA, Ayumi KASHIWADA

### 3 実験結果および考察

Figure 2 に EggPC(PC) と EggPA(PA) を一定の比率で混合したリポソームに対し、種々の濃度の  $Zr^{4+}$  を添加した際のリポソームの粒径変化を示した。

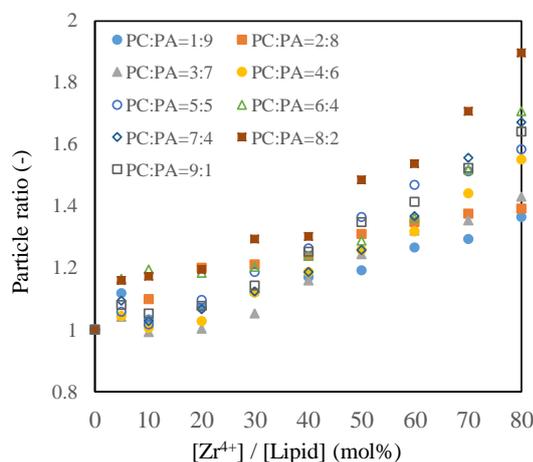


Figure 2 Change in particle size of various liposomes by addition of zirconium ion

PC と PA とからなるリポソームにおいて PC 組成を増加させるほど粒径が増大し、PA 組成を増加させるとリポソームの粒径変化が乏しくなった。これらの結果はアニオン性リン脂質である PA の組成を増加させるほどリポソームがより負に荷電するためリポソーム同士が反発し、膜融合に伴う粒径の増大が観測されなくなることを示している。

また、中性リン脂質である PC を主成分としたリポソームにおいて粒径の増大が観測された要因として適度に負に荷電したリン酸基に対し、 $Zr^{4+}$  が錯形成することでリポソーム表面の電荷を打ち消しリポソーム間の反発が弱まったためであると考えられる。

一方で、本研究で用いたリン脂質は金属イオンとの錯形成を誘導する因子としてリン酸基に着目したため、EggPG のようなヒドロキシ基を有するリン脂質を用いた系においても同様の実験を行い、本系の膜融合に対し、更なる標的認識を付加することもできると考えられる。

### 4 結言

本研究でリン脂質を構成するリン酸基に対する金属イオンの錯形成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  $Zr^{4+}$  を用いた PC と PA とからなるリポソームの粒径測定において PC 組成が高いリポソームにおいて粒径の増大を観測した。特に、PC:PA=8:2 の組成で得られたリポソームについて初期粒径の約 1.8 倍の粒径変化が観測されたことからリポソーム間における膜融合が示唆された。

以上の結果から、脂質の組成を制御することにより金属イオンを用いたリポソーム間における膜融合の制御が可能であると考えられた。

今後の研究においては、リポソームを構成するリン脂質を本系で用いた末端をトリメチルアミンでキャップされた中性脂質の PC や親水部がリン酸基のみで構成された PA に加えて、親水部がリン酸基とそのほかの官能基で構成されたリン脂質を用いることで、本系における金属イオンと官能基間の錯形成を利用した分子認識を主として金属イオンによる標的認識を可能としたリポソーム膜融合系を構築することを目標として金属イオン駆動型のリポソーム膜融合系の評価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.