

酵素反応に対する脂質ラフト（マイクロドメイン）の応答

（富山大院・薬¹，富山大・薬²） ○岡芳美¹，細貝亮²，上野雅晴¹

【序】リポソームは、生体の細胞膜を形成しているリン脂質から構成される人工の細胞膜様の二重膜であり、薬物送達の理想的な運搬体とみなされている。生体細胞の二重膜は、均一ではなくマイクロドメイン構造（ラフト構造）をとること、コレステロールが重要な役割を果たしていることが知られている。このラフトは、膜の流動性に直結しているため、外部刺激によってコレステロールの構造変化を誘起すれば、膜流動性の制御が期待できる。本研究の目的は、リポソーム中において、コレステロールオキシダーゼによりコレステロールをコレステノンに変換することにより、膜の流動性を制御できるのか実証することである（図1）。

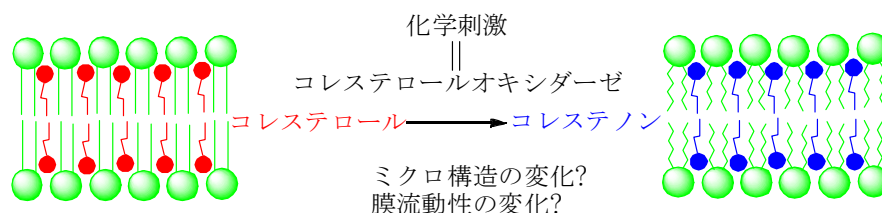


図1 本研究の概念図。「リポソームの構成成分、コレステロールとマイクロドメイン構の相関」に着目した。

【実験】リポソームは、合成リン脂質1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC)、1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) を用い、コレステロール (Chol) とのエタノール混合溶液を60 °Cにおいてリン酸緩衝液 (pH 7、50 mM) 中に注入することにより調製した。その後、限外濾過を行い、最終濃度を4 mM、Chol含有率を20%とした。リポソームの形状は、準弾性光散乱法とTEMにより確認した。このリポソーム中において、コレステロールオキシダーゼ (CHOD) を用い、Cholの酸化反応を誘導した。酸化反応で生成する過酸化水素を捕獲するため予めカタラーゼを添加しておき、1 μ molのCholに対し2 UのCHODを加え40 °Cで1日反応させた。反応は、高速液体クロマトグラフィーを用い、生成物コレステノンの240 nmの吸収により評価した。上記と同様のエタノール注入法でCholの代わりにコレステノンを用いたサンプルをコントロールとした。膜流動性は、スピンプローブ、5-ドキシルスチアリン酸 (5DS) を用いたESRのスペクトルより、オーダーパラメーターを算出し評価した。脂質濃度の2% (全濃度の1%) となる5DSにDPPC/DOPC/Chol懸濁液を加え、ボルテックスにかけた後、窒素雰囲気下で1時間以上置いた後、キャピラリーに詰めESR測定を行った。反応液 (CHOD添加後、40 °Cで1日)、コレステノン懸濁液についても同様に測定し比較を行った。

【結果と考察】エタノール注入法により調製したリポソームは、準弾性光散乱法により平均粒径が120 nm程度であることがわかった。また、TEMの観察から、一枚膜リポソームとなっており、

準弾性光散乱法で求めた粒径とほぼ一致していることを確認した(図2)。リポソームDPPC/DOPC/Chol中でのCholの反応後、DPPC/DOPC/コレステノンの場合においても、DPPC/DOPC/Cholとほぼ同様の形状であった。

反応は、高速液体クロマトグラフィーを用い、40℃で1日経過後の反応液とDPPC/DOPC/コレステノンを比較することにより、コレステノンの生成率として評価を行った(図3)。CHODとの反応により、75%のCholがコレステノンへと変換していることが明らかとなった。反応は3回行い、図3中に標準偏差も示した。

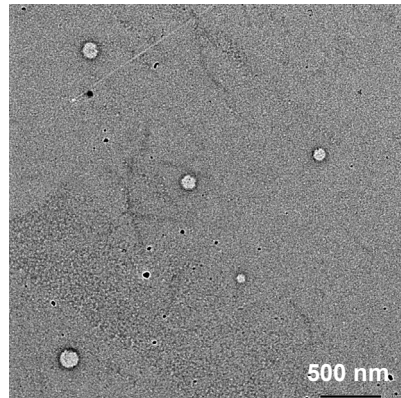


図2 エタノール注入法により調製したリポソーム DPPC/DOPC/Chol の形状

図4には、ESRのスペクトルから幾何学的方法により算出したオーダーパラメーターSを温度の逆数に対してプロットした。オーダーパラメーターは、0から1の間の値を取り、0に近い方が流動的であると評価できる。今回比較検討を行った3サンプルのすべてで、4℃～51℃の範囲で温度の上昇と共に流動的になっている。また、Cholの反応後とコレステノンのオーダーパラメーターはほぼ同様の温度依存性を示した。Cholと比較すると、反応後においては低温側(14℃)では流動性が低下し、高温側では逆に流動性が増していることが明らかとなった。この結果から、リポソーム中での酵素反応によって、膜流動性の変化を導くことができた結論付けられる。

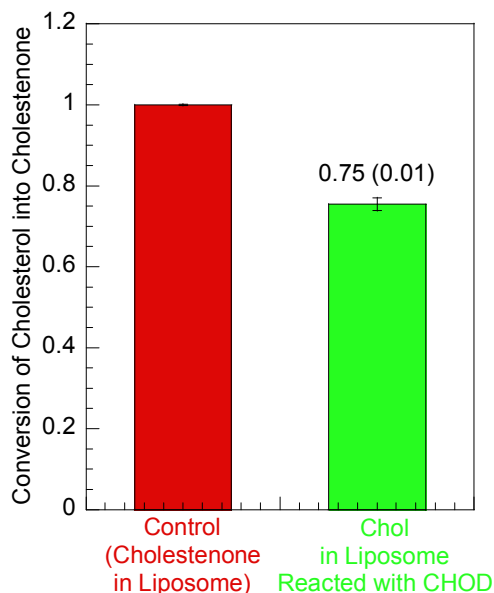


図3 リポソーム DPPC/DOPC/Chol におけるコレステノンの生成率

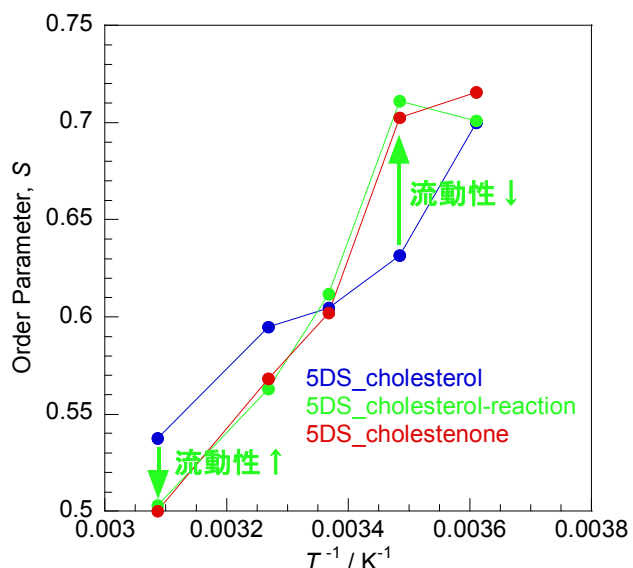


図4 ESR のスペクトルから算出したオーダーパラメーターSの温度依存性

本発表では、これらの詳細および最新の実験結果に関する考察について報告する。