

可逆的な形状変化に誘起される脂質ラフト（秩序液体相）の応答

(富山大・先端ライフサイエンス¹, 富山大院・薬², 富山大・薬³)○岡芳美^{1,2}, 細貝亮³, 上野雅晴^{2,3}

【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。コレステロールの構造変化を化学刺激により誘起したときのラフト構造の変化、膜流動性の変化については、昨年の本討論会で報告した。[1] コレステロールを20%程度含むモデル膜においては、図1のように、「曲率の違いによって異なる秩序相をとる」ことが報告されている。[2] そこで、本研究では、外部刺激によってコレステロールを含むモデル膜の形状変化を導くことにより、秩序液体相（ラフト相）や膜流動性の変化を誘起できるのではないかと考えた。本研究において、合成脂質を用いた三成分系一枚膜リポソームで、超音波照射と静置の繰り返しにより、膜の形状が可逆的に変化することを見出した。このときの膜の形状、秩序相、流動性の変化について比較検討を行った。

GUV（巨大一枚膜リポソーム）

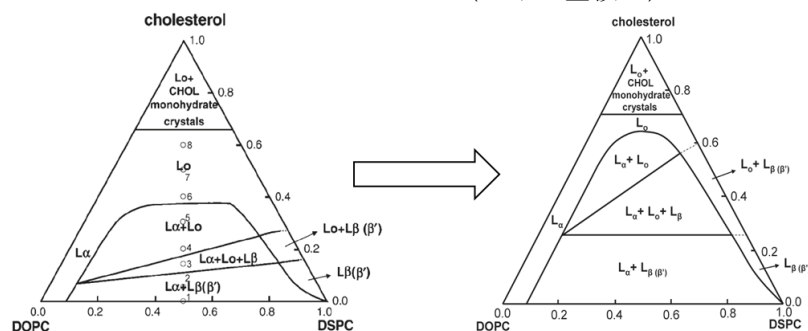
曲率の大きい（ $\sim 0.04 \text{ nm}^{-1}$ ）リポソーム（マイカ基板上）

図1 三成分系 DSPC/DOPC/Chol リポソームの 23 °C における相図[2]

【実験】一枚膜リポソームを、以下のエクストルージョン法（加圧押し出し濾過）で調製した。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）とのクロロホルム混合溶液に窒素ガスを吹き付けて蒸発させた後、減圧乾燥させ、脂質フィルムを作製した。その後、リン酸緩衝液（pH 7、10 mM）を加え、加熱とボルテックス操作により懸濁させ、凍結融解を行った後、エクストルーダーを用い、30 °C で孔径 600 nm のマイクロフィルターを 3 回通した。脂質濃度を 400 μM 、Chol 含有率を 20%（100 μM ）とした。このリポソームにおいて、超音波照射（バス型）と静置の繰り返し実験を行った。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。秩序液体相（ L_0 ）は、この相を選択的に検出できると報告のある蛍光プローブの組み合わせ、Dehydroergosterol（DHE）と 3,3'-Diocetadecyloxycarbocianine（DiO）を用いた蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）により評価した。[3] 膜流動性は、1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene（DPH）を用いた蛍光異方性により評価した。それぞれの測定は、15, 25, 35 °C で行い、Chol

を含有しないサンプルと比較検討した。

【結果と考察】エクストルージョン法により調製したChol含有率20%の一枚膜リポソームは、平均粒径が450 nm程度であった。このリポソームを用いて、超音波照射と静置の繰り返し実験を行い、形状、秩序相、膜流動性の変化を調べた。図2に示したように、超音波照射によりSUV (small unilamellar vesicle) が形成され、10分間の静置で、LUV (large unilamellar vesicle) へと膜融合が起こることが確認できた。この経過をFRETにより評価を行ったところ、超音波照射後 (SUVリッチ状態)、25 °C においてはFRET強度が小さくなったことから、秩序液体相 (L₀相) が減少し、無秩序液体相 (L_α相) になったのではないかと推測される。また、25 °C で10分間の静置後 (LUVリッチ状態) では、FRET強度が回復したことから、L_α相がL₀相に戻ったのではないかと考えられる。これらの結果は、「曲率の違いによって異なる秩序相をとる」ことと矛盾しない。

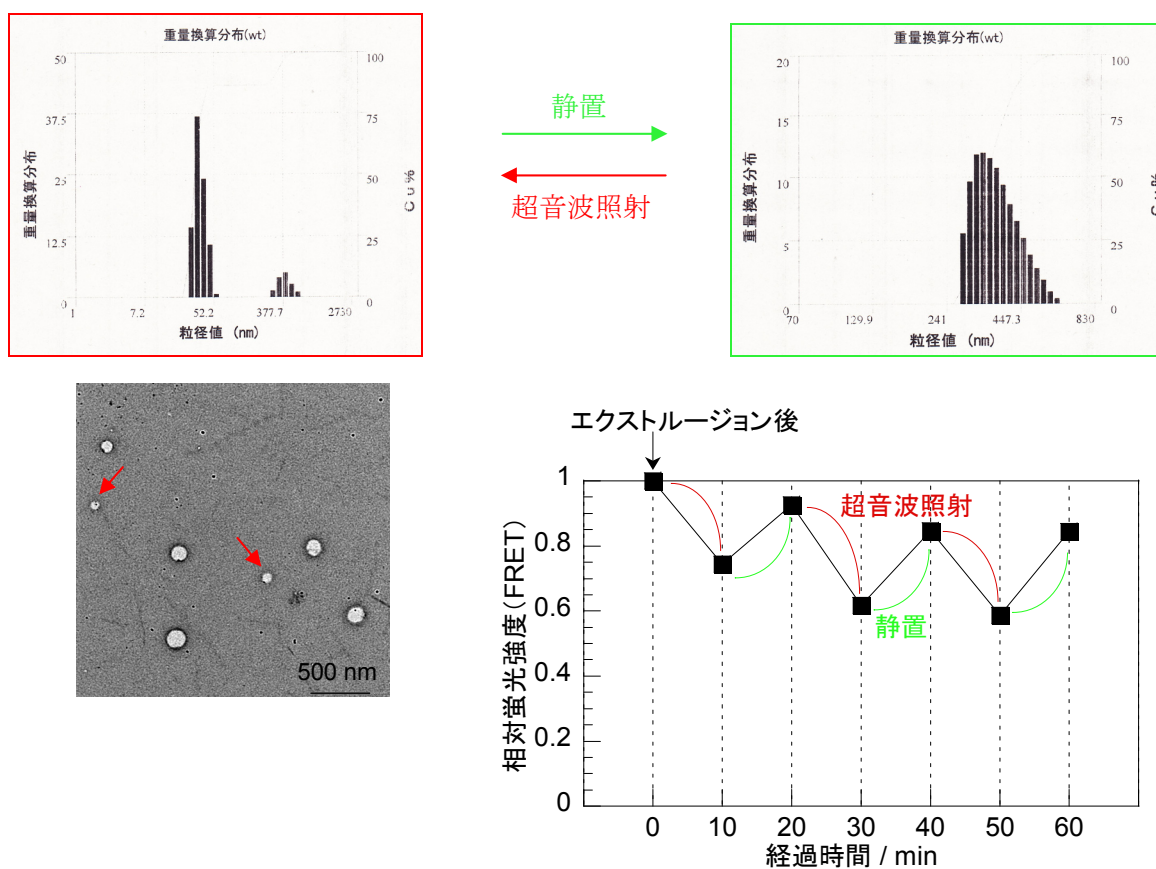


図2 三成分系 DPPC/DOPC/Chol リポソームにおける超音波照射及び静置後の形状 (上図、左下図) と FRET (右下図、25 °C) の変化

詳細は、Cholを含有しないサンプルとの比較、膜流動性の評価も併せて報告する予定である。

【参考文献】

[1] 岡芳美、細貝亮、上野雅晴、第4回分子科学討論会 3P074 (2010).
 [2] E. I. Goksu, M. L. Longo, *Langmuir* **2010**, *26*, 8614.
 [3] J. T. Buboltz, C. Bwalya, K. Williams, M. Schutzer, *Langmuir* **2007**, *23*, 11968.