

リン脂質の酸解離平衡を利用したベシクル内部への物質輸送

(神奈川大理¹, 東大院複雑系生命システム研究セ², 東大院総合³)
 鈴木健太郎^{1,2}, 網干亮³, 大倉優作³, 栗原顕輔³, 豊田太郎^{2,3}, 菅原正^{1,2}

Transportation to an Inner Water Pool of Giant Vesicles on the Basis of Vesicular Adhesion and Fusion Caused by an Acid-Dissociation Equilibrium of Phosphor Lipids

(Kanagawa Univ.¹, Univ. of Tokyo²)

Kentaro Suzuki^{1,2}, Ryo Aboshi², Yusaku Okura², Kensuke Kurihara², Taro Toyota², Tadashi Sugawara^{1,2}

【序】

リン脂質が水中で自己集合して形成されたベシクルが示す分散と凝集に関する研究は、人工細胞研究やドラッグデリバリーへの活用などで注目されている。コロイドの一種であるベシクルが、分散液中で準安定的に拡散できるのは、ベシクル間に働く引力的な van der Waals 相互作用に対して、電気二重層間の静電相互作用が斥力的に働くことによる。通常コロイドは、pH 変化による酸解離平衡などにより電気二重層を破壊すれば、すみやかに凝集が起こる。ところが、ホスファチジルコリン(PC)のような両イオン性脂質の場合は、リン酸部位をプロトンしてもカチオン性部位が残るため(Fig. 1)、pH を低下しても膜表面の電荷が失われることはない。ところが、昨今我々は、PC からなるベシクルに、10%の PG を混入させたハイブリッドベシクルでは、特定の pH 周辺で凝集および融合が起こることを見いだした[1]。この現象には、ベシクルを構成する脂質分子の酸解離平衡に加え、試料調整時の組成ゆらぎが重要な働きをする。また、ここで見られる機構を応用することで、ターゲットを指定したベシクル内水相への分子輸送が実現された。[2]

【結果と考察】

1. 組成ゆらぎによって実現される特定 pH でのハイブリッドベシクル凝集

両イオン性リン脂質 POPC (PC)と、アニオン性リン脂質 POPG(PG)とからなるハイブリッドベシクル (PC:PG = 9:1)を、クロロホルム溶液から薄膜法により調整した。これらベシクル分散液に、1 N HCl 溶液を滴下し、分散液の pH を酸性へと変化させたところ、pH 2.5 付近で凝集体の形成を確認した。一方、pH 2 以上および 3 以下の溶液では、凝集は見られず、ベシクルは分散したままであった。さらに、凝集状態にあるベシクルを、半日以上静置するとベシクル同士が融合した。

ここで見られるダイナミクスは、ハイブリッドベシクルを構成するリン脂質の酸解離平衡に関連づけられる。リン脂質ベシクルの親水部のホスフェート部位は、分散液の pH 低下と共にプロトンされる(Fig. 1)。これにより膜上にあるホスフェートの数が減少し、もともと全体としてアニオン性を呈していたハイブリッ

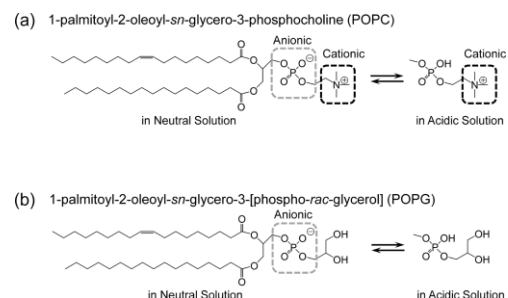


Fig. 1 PC および PG の酸解離平衡

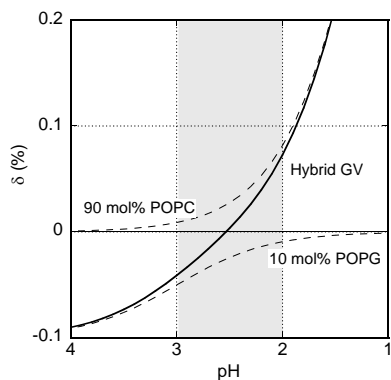


Fig. 2 ハイブリッドベシクル表面電荷の pH 依存性

ドベシクル表面のアニオン性は低下する(Fig. 2, 3)。さらに、アニオン性の源であるプロトネーションされていない PG の数よりも、カチオン性の源であるプロトネーションされた PC の数が勝ると、ハイブリッドベシクル表面電荷はカチオン性へと変化していく。PC および PG の pK_a はそれぞれ 1 および 3 付近にあるため、膜表面がアニオン性からカチオン性に切り替わる pH はほぼ 2.5 付近となる(Fig. 2)。このことから、ベシクル凝集は、ハイブリッドベシクルの表面電荷と関連していると考えられる。しかし、この pH 付近であっても、 pK_a が 1 である PC の 97% は、プロトネーションされずに残っている。そのため、ハイブリッドベシクルの電気二重層は、中性における PC ベシクルと同程度には存在しており、表面電荷がゼロになることが接着の直接の原因とは考えにくい。そこで、ベシクル組成のゆらぎに着目した。薄膜法における薄膜調整時において、ベシクルの組成は仕込み比を中心とした分布を持ち、計算上表面電荷がゼロとなる pH においても、PG 含有量が少なくカチオン性を呈すベシクルと、逆に PG 含有量が多くアニオン性を呈すベシクルとが多数存在し、それらの間に静電引力が生じると考えられる(Fig. 3)。またこの機構では、接着した膜間の相互作用は、膜面内の一部のアニオン種とカチオン種との間で局所的に起こるため、部分的に膜構造のほつれが起きやすく、膜全体で複数のベシクルが均等に接合する場合よりも、ベシクル間融合が生じ易いのではないかと考えられる。このように、一見均質な系であっても、それらのわずかの組成ゆらぎから個々の要素が新しい役割を獲得し、特徴的な集団挙動が出現する機構は興味深い。

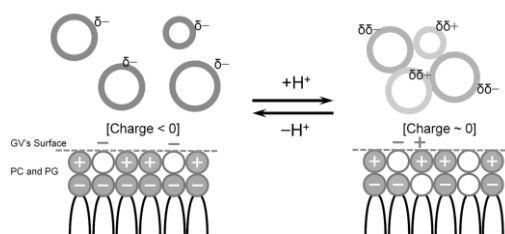


Fig. 3 組成ゆらぎに起因するベシクル接着過程の模式図: ベシクル膜の表面電荷(上)。リン脂質の親水部の電荷(下)

2. ベシクル組成比の違い特定 pH でのハイブリッドベシクル凝集

リン脂質の酸解離平衡を利用した、ベシクル間融合を利用して、標的となるベシクル内水相に、輸送体ベシクルを利用して分子輸送を行うことを試みた。輸送体と標的との役割を明確化するために、酸添加後のベシクル表面電荷を考慮して、両ベシクルの組成を調整した。輸送体ベシクルは、PG とコレステロール (Chol) の比率が 9:1 のベシクルをメンブレンフィルタにより粒径を 0.1 μm に調整し、輸送物として水溶性フルオロセインを内封した。一方標的ベシクルとしては、PC:PG:Chol = 8:1:1 の比率で調整したジャイアントベシクルを用いた。これらベシクル表面電荷は、中性の溶液中ではともにアニオン性を呈すが、酸性条件では輸送体ベシクルのみがカチオン性となり、標的ベシクルとの間に引力的相互作用が期待される。実際に、これらの分散液を混合し pH を 3 付近まで下げると、標的表面上に輸送体が接着と、さらに約半日程経て標的の内水相への蛍光分子の輸送が行われたことが確認された[2]。

この結果を踏まえ、本系による物質輸送の酵素反応系への利用を確認するために、PCR 酵素反応系のうち、反応基質である dNTP 以外を封入した標的ベシクルに、dNTP を内封した輸送体ベシクルを、先と同様の操作で融合させた。その後、PCR 熱サイクルを作用させると、標的ベシクル内での DNA の複製反応の進行が確認された[3]。