生体膜と細胞のモデルとしての高分子単分子膜および高分子リポソーム

K. Dorn · H. Ringsdorf

Institute of Organic Chemistry, University of Mainz

1. はじめに

このレビューは、高分子科学が生体膜と細胞のモデル系に寄与できるきわめて大切な問題について解説するものである。例えば、リンパ球がガン細胞を攻撃するような現象を、人工的に具現化することが可能となるであろう。リンパ球がガン細胞と接触すると、ガン細胞の安定化は低下し、ついには破壊されてしまう。しかし、この時にリンパ球の膜は安定に保持され、まったくと言ってよいほど変化しないのである。このような細胞—細胞間の相互作用を人工的なモデル系で模倣させるには、いくつかの問題点を解決しなければならない。まず第1には、生体膜と人工膜を接触させた場合、低分子の脂質のみで構成されている人工膜ではその安定性が低すぎるという欠点があり、モデル系での膜の安定性を向上させねばならないということである¹⁾。次に、安定化させた膜が目標の膜に対して特異的な識別機能を持たせる必要があり、これにより膜を開裂させる膜破壊剤を制御した方法によって放出させることも可能となるであろう。

2. 高分子膜モデル

Singer-Nicolson モデル²⁾を見ると、生体膜はリン脂質、そこに貫通して埋め込まれたタンパク質と単に吸着したタンパク質から構成されていることがわかる。これらの膜タンパク質は生体膜の安定性に最も大きな寄与を果たしていることがわかる³⁾。しかし、抽出した膜タンパク質を人工脂質膜系に混入させて安定性を付与させることはまだ実現していない。そこで脂質マトリックス自体の安定性を安上させる試みが行なわれている。最近、脂質に重合可能な官能基を導入させ、これらの脂質を単分子膜、リポソーム、黒膜のように生体膜と類似の配向をとらせた後に重合させることができるようになった^{4)~8)}。

第1表に示した構造の脂質に関し、単分散とリポソームについて調べ、さらにそれらの重合挙動について

Polymeric Monolayers and Liposomes as Model for Biomembranes and Cells

も検討した。

3. 単分子膜

3-1. 脂質モノマーの拡張性

いかに単分子膜を調べたかという基本原理を第1図に示した。親・疎水性の脂質モノマーを有機溶媒に溶かし、水の表面に滴下した。そのフィルムの圧縮は適当な方法で疎水性の鎖を配列させることによって行ない、UV 照射によって重合が可能である。通常、表面圧と面積の等温線(第1図)はa) 気体、b) 濃縮液体、c) 固体(頭部のパック)、d) 固体(鎖のパック)に類似した相の存在が認められた。

異なった脂質モノマーが集合体を形成する場合の疎水性鎖の影響をこの方法で検討すると、30°C でジステロイルレシチンはまだ濃縮状態であるのに対し⁹⁾、炭素原子数の同じブタジエン・レシチン[5]は広がった状態となっている。またジアセチレン・レシチン[7]は26個の炭素原子を持っているけれど、広がった状態と濃縮された状態の両方を形成している。これは、脂質モノマーの二重結合と三重結合によって疎水性側鎖のパッキングが阻害されるためであると考えられる。

3-2. 単分子膜重合

高度に配向した脂質モノマーフィルムは簡単に窒素下で紫外線照射によって重合できる。ジアセチレン脂質モノマー[3][6~9]の重合は局所的な化学反応^{10),11)}であり、脂質モノマーが結晶状態、あるいは単分子¹²⁾か多分子¹³⁾で配向している場合にのみ生起す

π : 表面圧, A : 面積

第1図 単分子膜のキャラクター化の原理
—表面圧-面積等温線

第1表 リポソームを形成する重合性脂質

Type	構造式	番号	文献
a	$\begin{array}{l} \text{R}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CO}-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2 \text{ Br}^- \\ \text{R}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CO}-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2 \text{ Br}^- \\ \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{15}-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2 \text{ Br}^- \\ \text{R}-\text{O}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2 \text{ Br}^- \end{array}$	[1]	23)
b	$\text{H}_2\text{O}_3\text{PO}-(\text{CH}_2)_9-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_9-\text{OPO}_3\text{H}_2$	[3]	33)
c	$\begin{array}{l} \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{12}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{O}-\text{X} \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{12}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{O}-\text{X} \\ \text{X}: -(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-(\text{CH}_2)_2- \text{ Br}^- \\ \text{X}: -\text{CH}_2-\underset{\text{O}^-}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{PO}-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{12}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_8-\text{CO}-\text{O}-\text{X} \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{12}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_8-\text{CO}-\text{O}-\text{X} \\ \text{X}: -(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-(\text{CH}_2)_2- \text{ Br}^- \\ \text{X}: -\text{CH}_2-\underset{\text{O}^-}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{PO}-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \\ \text{X}: -(\text{CH}_2)_2-\text{NH}^+[(\text{CH}_2)_2-\text{SO}_3^-]-(\text{CH}_2)_2- \\ \text{X}: -[(\text{CH}_2)_2-\text{O}-]_3-(\text{CH}_2)_2- \end{array}$	[4] [5] [6] [7] [8] [9]	34) 34) 5) 34) 35) 5)
d	$\begin{array}{l} \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{17}-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2 \text{ Br}^- \\ \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{17}-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{R} \\ \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CO}-\text{O}-\underset{\text{O}^-}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{R} \end{array}$	[10] [11]	36) 37)

R: CH₂=C(CH₃)-CO

る。重合物は共役した高分子鎖を形成し、青または赤を呈する [(1) 式]

この可視スペクトルの吸光度変化で重合度を評価することができる。

一方、ブタジエンとメタクリル酸系のモノマー [1], [2], [4], [5], [10], [11] は液体中に広がった状態であっても重合することができる。ブタジエン脂質は単分子膜中に、1-4-トランスポリブタジエンを形成することがすでに示されている¹⁴⁾ [(2) 式]。

得られるポリマーフィルムは対応するモノマーフィルムに比べ占有面積は小さく、圧縮性はほとんどの

い。この現象はバルクあるいは溶液重合 [5], [7] においても観察され、重合反応の定量的な追跡に用いることが可能である¹²⁾。

ポリジアセチレン膜は共役した二重結合と三重結合によって非常に高い剛直性と機械的安定性を示し、例えば、約 0.5 mm の穴をあけ、空気中では何カ月かの間、穴を不安定化することなく保持することができる。このようなポリジアセチレン膜に比べブタジエンとメタクリル酸系の高分子脂質膜はおそらくよりよい膜モデル系であると考えられる。というのは、その高分子

第2図 重合性脂質からの高分子ベシクルの形成

鎖はまだ流動性を残しており、ポリジアセチレン膜ほどに過度に剛直でないからである。

気体/水界面での単分子膜はタンパク質などのような吸着現象の研究に有用であるが、生体膜自体は二重膜構造を有しているので完全に理想的な生体膜モデルではない。そこで、高分子単分子膜を二重膜、とくにリポソームへ応用する試みを行なった。

4. 高分子リポソーム

4-1. リポソームの形成

リポソームの調製については数多くの方法が知られている。近年、1分子中に1個^{15)~20)}あるいは2個²¹⁾, ²²⁾の長い鎖を持つ多種多様な単純構造の親・疎水性脂質を超音波でベシクルにすることが可能となった。

重合性脂質は水中に分散させた後に超音波によって無色で透明あるいは半透明のリポソームを形成する。このリポソームを数日間保存すると無色透明に変化した²³⁾。電顕観察から、リポソームは二重層と多重層となっており、100 nm~数 μ の直径を持つ球形粒子であることが確認された。リポソームの直径と二重層の比率は超音波の放射時間と強度に大きく影響される。30分の超音波処理という条件下で二重層のみの直径が約100 nmのリポソームを形成することが明らかにされた²⁸⁾。

4-2. リポソームの重合

第2図に示したように、脂質モノマーのベシクルに紫外線を照射するとポリマーベシクルとなる。ジブセチレン系脂質モノマー[3], [6~9]の場合、重合反応は赤を経由して青への変化によって追跡できる。これらの高分子ベシクル分散系の可視スペクトル

は高分子単分子膜の場合と全く同様に定量することができる。

色変化以外にこのような重合反応はDSC (differential scanning calorimetry) によって追跡することができる。

ブタジエン脂質モノマーのベシクルの高分子化は、260 nmの吸収と同様にポリマーベシクル分散溶液の凍結乾燥の残存物のGPC測定によっても確認された。GPC測定は、メタクリル酸系脂質のポリマーベシクルの形成の確認にもまた有効であった。紫外線によって重合したベシクルの電顕観察によって、重合に伴い球状のベシクルの形や大きさがほとんど変化せず、紫外線重合を行なってもリポソームはもとのままであることが証明された。

4-3. 二重層の安定性

高分子化したベシクルの高い安定性はいくつかの実験によって示されてきた。例えば、高分子ベシクル溶液を50%エタノールで希釈しても沈殿を起こさない。同様に、300 nmの濁度測定で、モノマーベシクルが同条件下で破壊され濁度が顕著な減少を示すのに対し、ポリマーベシクルではほとんど変化しないのである²⁹⁾。また、6-カルボキシフルオロセインのような埋入物質の放出について、通常の脂質ベシクルと比較して検討し、結果を第3図に示した。ブタジエン脂質モノマー[5]ベシクルの場合、40時間後に90%を放出する(第3図右)のに対し、ジパルミトイルレシチン(DPPC)では10%しか放出せず、高分子ブタジエンベシクルはほとんど全く放出を起こさなかった。さらにドデシルスルホン酸ナトリウム(SDS)の添加効果を検討したところ、ブタジエン脂質モノマーとDPPCのベシクルはSDS低濃度域で破壊されるのに対し、高分子リポソームでは 2×10^{-3} mol/lのSDS濃度で安定性が保たれている(第3図左)。

5. 表面の識別

5-1. レクチンを媒介した凝集

レクチンは糖を識別し容易に用いることができるので、まず初めに識別物質として糖、頭部にレクチンを有する脂質を用いて識別の実験を行なった。レクチンはタンパク質であり、糖に対する特異的な結合サイトを有し、植物中に存在する。例えば、コンカナバリンA(Con A)は α -マンノースや α -グルコースに対する特異性を有し、それぞれに特異的結合サイトを持つサブユニットの四量体である。低分子量の糖をレクチン溶液に入れるとレクチンの結合サイトは糖と完全に結合し、しかも溶液は完全に透明のままである。しか

第3図 埋入 6-カルボキシフルオロセインの放出
(左) SDS 添加の影響, (右) 時間の影響

し、リポソームや細胞のような分子集合体中の一部に糖が存在すれば、レクチンはそのような分子集合体を凝集させ、この凝集反応は沈殿として観察される^{24), 25)}。このような凝集体に低分子量の糖を加えると、低分子糖と分子集合体との間に競合的な交換が生起する。これにより、沈殿物は再溶解してもとのリポソームや細胞の溶液にもどるのである。

5-2. 重合性糖脂質

糖の頭部構造を持つ重合性糖脂質を合成し、この糖脂質溶液に超音波をかけると無色透明の溶液となり、紫外線で重合させると高分子ジアセチレンリポソームのような透明な赤い溶液となる。この溶液にレクチン・Con A を加えると数秒間で凝集が起り、赤い沈殿と無色透明の上澄みとなる²⁶⁾。この凝集は可逆的である。すなわち、 α -メチルマンノピラノシドを加えると、その赤い沈殿は再分散し、もとの高分子リポソーム溶液と同じ透明な赤い溶液となる。このような凝集は糖を表面に持たないベシクルでは生起しない。現在、レクチンをリポソーム膜中に導入し、糖を持つリポソームとの間でリポソーム-リポソーム間の識別を行なわせる試みを検討している。

他の膜タンパク質を高分子化した二重膜中に導入することはすでに成功している。すなわち、 F_0F_1 -AT Pase を重合性のジアセチレン脂質に共存させ、モノマーとポリマーのリポソーム中に導入することができることを明らかにした²⁷⁾。

6. 選択的開裂

膜の破壊剤の制御放出を議論するためには、まず最初にリポソームがビンのコルク栓の役割をするような領域を持つことが必要である²⁸⁾。このような敏感な領域は、光照射²⁹⁾、pH 変化³⁰⁾、温度上昇³¹⁾、あるいは酵素作用などの方法によって不安定化し開裂させられる。

例えば、酵素作用を例にとるとホスホリパーゼ A_2 によってリン脂質膜の加水分解が起こる。この酵素はリン脂質のエステル結合を分解し、水に可溶なリソリン酸脂質と脂肪酸になり、これによって膜破壊が起こる。

第4図 ホスホリパーゼ A_2 の天然リン脂質と重合性脂質混合系の単分子膜への作用

a: DLPC のみの場合, b: 非相溶系, c: 相溶系

第5図 混合系単分子膜に対するホスホリパーゼの作用時間と相対面積濃度の関係

天然リン脂質と重合性脂質とを混合して高分子化した単分子膜に対するホスホリパーゼ A_2 の作用を調べた³²⁾。第4図に示したようにそれぞれの脂質の相容性によって、相溶系（均一分布）および非相溶系（相分離）を区別した。両方の系で酵素は天然脂質成分を加水分解し、これは表面積の減少として観察された。しかし、第5図に示したように加水分解の速度はそれぞれの系で異なった。すなわち、天然リン脂質のジラウロイルレシチン (DLPC) 単分子膜は酵素を加えてから数分以内で完全に加水分解された（第5図, a）。これに対し、DLPC と非相容性の重合性脂質 [9] 1:1 混合系では、加水分解の速度は遅くなり（第5図, b）、最終的には DLPC のみが完全に加水分解され面積はもとの 50% となった。1:1 の相溶系ではさらに加水分解の速度は著しく抑制された（第5図, c）。以上の結果は、DLPC 分子が重合した脂質に取り囲まれるために、ホスホリパーゼ A_2 の作用が阻害されるものと考えられる。このような実験は、天然の脂質成分が高分子脂質成分を破壊することなく単分子膜から可溶化することを示している。以上の結果をリポソーム系に適用することができれば、制御した方法によって開裂する安定な薬剤担体系に応用することができよう。

文 献

- 1) G. Poste: *Liposomes in Biological Systems*, edited by G. Gregoriadis, A. C. Allison, Wiley, New York (1980) p. 105
- 2) S. J. Singer, G. L. Nicolson: *Science*, **175**, 720 (1972)
- 3) S. J. Singer: *Cell Membranes*, edited by G. Weissmann, R. Clairborne, HP Publ. (1975) p. 44
- 4) D. Day, H. -H. Hub, H. Ringsdorf: *Isr. J. Chem.*, **18**, 325 (1979)
- 5) H. -H. Hub, B. Hupfer, H. Koch, H. Ringsdorf: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **19**, 938 (1980)
- 6) H. -H. Hub, B. Hupfer, H. Ringsdorf: *Am.*

- Chem. Soc. Org. Coat. Plast. Chem.*, **42**, 2 (1980)
- 7) D. S. Johnston, S. Sanghera, M. Pons, D. Chapman: *Biochem. Biophys. Acta*, **602**, 57 (1980)
 - 8) S. L. Regen, B. Czech, A. Singh: *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 6638 (1980)
 - 9) H. -D. Dörfler, W. Rettig: *Colloid Polym. Sci.*, **258**, 839 (1980)
 - 10) R. H. Baughman: *Contemp. Top. Polym. Sci.*, **2**, 205 (1977)
 - 11) G. Wegner: *Makromol. Chem.*, **154**, 35 (1972)
 - 12) D. Day, H. Ringsdorf: *J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed.*, **16**, 205 (1978)
 - 13) B. Tieke, G. Lieser, G. Wagner: *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **17**, 1631 (1979)
 - 14) H. Ringsdorf, H. Schupp: *Am. Chem. Soc. Org. Coat. Plast. Chem.*, **42**, 379 (1980)
 - 15) E. Baumgartner, J. -H. Fuhrhop: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **19**, 550 (1980)
 - 16) G. Gregoriadis: *Liposomes in Biological Systems*, edited by G. Gregoriadis, A. C. Allison, Wiley, New York (1980) p. 25
 - 17) W. R. Hargreaves, D. W. Deamer: *Biochemistry*, **17**, 3759 (1978)
 - 18) M. K. Jain, C. J. A. van Echteld, F. Ramirez, J. de Gier, G. H. de Haas: *Nature* (London), **284**, 486 (1980)
 - 19) T. Kunitake, Y. Okahata, M. Shimomura, S. Yasunami, K. Takanabe: *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 5401 (1981)
 - 20) Y. Okahata, T. Kunitake: *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 5231 (1981)
 - 21) J. H. Fendler: *Acc. Chem. Res.*, **13**, 7 (1980)
 - 22) T. Kunitake: *J. Macromol. Sci.-Chem.*, **A-13**, 578 (1979)
 - 23) A. Akimoto, K. Dorn, L. Gros, H. Ringsdorf: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **20**, 90 (1981)
 - 24) I. J. Goldstein, editor: *Carbohydrate-Protein Interaction*, ACS Symposium Series, Vol. 88, Washington, D. C. (1979)
 - 25) R. J. Hampton, R. W. Holz, I. J. Goldstein: *J. Biol. Chem.*, **255**, 6766 (1980)
 - 26) H. Bader, H. Ringsdorf, J. Skura: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **20**, 91 (1981)
 - 27) N. Wagner, K. Dose, H. Koch, H. Ringsdorf: *FEBS Letters*, **103**, 313 (1981)
 - 28) L. Gros, H. Ringsdorf, H. Schupp: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **20**, 305 (1981)
 - 29) K. Kano, Y. Tanaka, T. Ogawa, M. Shimomura, Y. Okahata, T. Kunitake: *Chem. Lett.*, **1980**, 421
 - 30) M. B. Yatvin, W. Kreutz, B. A. Horwitz, M. Shinitzky: *Science*, **210**, 1253 (1980)
 - 31) J. N. Weinstein, R. L. Magin, M. B. Yatvin, D. S. Zaharko: *Science*, **204**, 188 (1979)
 - 32) R. Buschl: Private Communication
 - 33) H. Bader: Ph. D. Thesis, Mainz (1982)
 - 34) B. Hupfer, H. Ringsdorf, H. Schupp: *Makromol. Chem.*, **182**, 347 (1981)
 - 35) H. Koch, H. Ringsdorf: *Makromol. Chem.*, **182**, 255 (1981)
 - 36) K. Dorn: Ph. D. Thesis, Mainz (1982)
 - 37) A. Nicksch: Ph. D. Thesis, Göttingen (1980)
 - 38) B. Hupfer: Ph. D. Thesis, Mainz (1981)
- 抄訳：岡野光夫（東京女子医科大学 医用工学研究施設）

(839 頁より続く)

さらには、遺伝子の導入によって適当な微生物株や細胞株を育種し、複合的な酵素系をもった細胞自体を一種のバイオリアクターとして利用しようとする研究や、育種によって生物自体をより利用価値の高いものにしようとする研究など、夢多い広がりをもって進められている。また遺伝子病との関連などで医学への利用を考慮されているが、これらについてはまだ未知のことも多く、慎重な基礎実験を重ねていかなければならないことはいうまでもない。

遺伝子工学は、遺伝子という物質自体の生産を目的とするものではなく、DNA 分子のもつ情報を利用するものであり、適当な遺伝情報を、もともと生物のも

っている膨大な遺伝情報システムの中に導入し、システム全体の調和を保ちつつ、目的とする物質を有効に生産させるとか、利用価値の高い生物を育種しようというものである。バイオテクノロジーの一環として多面的な展開が期待されるが、基礎的な遺伝情報システムの研究にまたなければならぬ点も多々残されている。

文 献

- 1) 遺伝子操作実験法, 高木康敬編著, 講談社サイエンスフィク (1980)
- 2) いずれも, *Methods in Enzymology*, **65**, 499~580 (1980), Academic Press に記述されている