リン脂質と中性脂質の相互作用と構造形成について

半 田 哲 郎

京都大学薬学部 ☎ 606-01 京都市左京区吉田下阿達町

Structure-Organization of Phospholipid-Neutrallipid Mixtures in Aqueous Phase

Tetsurou Handa

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto, 606-01 Japan

Interfacial equilibria among various liquid-crystalline structures of lipid and lipid mixtures are reviewed and the physiological relevance of the equilibria is discussed. Phospholipid-neutrallipid mixtures form various liquidcrystalline structures, including bilayers, micelles, emulsions, reverse hexagonal and reverse cubic structures. Neutral lipids, such as triglycerides, cholesterylesters and ubiquinone-10 have very limited solubilities in bilayers of phosphatidylcholine (PC). Excess amount of neutral lipid is separated from the bilayers and forms the droplets in an aqueous medium. The droplets are covered by the PC monolayers spread from the bilayers, and are stabilized as emulsion particles. Lipoproteins, chylomicrons and very low density lipoproteins, in animal plasma are such particles containing a very small amount of several different apoproteins. The lipid composition of emulsions influences the affinity to apoproteins in plasma, and controls the catabolism of the particles *in vivo*.

Some other neutral lipids, such as diglycerides, monoglycerides, α -tocopherol and menaquinone-4 have large solubilities in the PC bilayers. Addition of such a neutral lipid to the bilayers occasionally induces formation of irregular structures (intrabilayer-particles or -micelles) and vesiculation of the bilayers. The intrabilayer-structures are considered to be precursors for reverse hexagonal and reverse cubic structures. Diglycerides and α -tocopherol in the PC bilayers activate phospholipases A₂, C and D.

Key Words : structure-organization, phospholipid-neutrallipid mixtures, bilayers, emulsions, lipoproteins, reverse hexagonal structure, reverse cubic structure.

1. はじめに

動物体内の脂質分子集合体の構造として、細胞膜などの2分子膜 (bilayers) がよく知られている。しかし、肺胞表面で bilayers と動的平衡を保ちながら呼吸機能に関与しているのはリン脂質 (PL) の単分子膜 (mono-

layers) である¹⁾。血液中で高カロリー源のトリグリセライド (TG) やコレステリルエステル (CE) を運搬するリポ蛋白, chylomicrons (CM), very low density lipoproteins (VLDL) や low density lipoproteins (LDL) は中性脂質 (TG, CE) の液滴が表面の PL 単分子膜により水中に安定化されたエマルション (emulsions)

Phosphatidylcholine (PC)

Ubiquinone-10 (Q₁₀) Menaquinone-4 (MQ₄)

Fig. 1. レシチン(PC)と中性脂質

である。また、ミセル (micelles) 様の high density lipoproteins (HDL) も知られている。血液中のこれらの脂質分子集合体の間の脂質の移動は代謝エネルギーを必要とせず、脂質分子の物理化学的ポテンシャルによって支配されている¹⁾。医療用に実用化されている脂肪乳剤はレシチン (PC)/トリグリセライド (TG) エマルジョンであり、CM とほぼ同じ異化を体内でうける²⁾。

一方、PC 2 分子膜にジグリセライド (DG) が添加されるとその構造が乱れ、ついには逆ヘキサゴナル構造(H_{II})を生成する。H_{II}、あるいは、そのプリカーサーは 2 分子膜の融合や各種 phospholipase の活性化を誘導し、膜における情報伝達メカニズムに関係すると考えられている³⁾。

このように、体内で種々の脂質分子集合体の重要な働きが明らかになりつつある。しかし、これらの間の平衡、脂質分子の交換などの生物物理学的研究は少ない。本稿

Fig. 2. 中性脂質 (A あるいは B) 添加による 2 分子膜構造変化

A : TG, CE, Q₁₀, VEA など, B : DG, VE, MG, MQ₄ など

では、おもに界面化学的手段による筆者らの研究例を紹介する。

2. エマルジョンかヘキサゴナル II か

レシチン (PC) 2 分子膜に中性脂質が添加されても全ての場合にエマルジョンが形成されるわけでない。Fig. 1 に示すような TG, CE, ユギキノン-10(Q₁₀) あるいはビタミン E アセテート (VEA) などは PC と水中に共分散されれば、安定な乳花分散粒子 (Fig. 2 参照) を生成する¹⁾。chylomicrons や VLDL は TG や CE が PC によって安定化された乳花粒子 (エマルジョン) である¹⁾。

一方、DG やビタミン E (VE) は PC と共には乳花粒子 (エマルジョン) を形成しない。2 分子膜は DG 添加により H_{II} に変化する (Fig. 2 参照)³⁾。H_{II} 構造は non-bilayer 構造の 1 つである。H_{II} を PC の 2 分子膜に誘導する DG は細胞内の情報伝達物質として注目されている。筆者等は、DG が PC 2 分子膜に対する phospholipase D の活性を増大させることを見出した⁴⁾。また、モノグリセライド (MG) は PC 2 分子膜を bicontinuous cubic phase へと変化させる⁵⁾。この cubic phase も H_{II} と同様に逆トポロジーの non-bilayer 構造の 1 つである。

3. エマルジョンと 2 分子膜の平衡と共存

PC が水中に安定に形成する構造は 2 分子膜 (bilayers), あるいは、これが層状に積み重なったラメラ一相 (lamellar phase) である。liposomes (リポソーム) は単一あるいは複数の 2 分子膜が、球状または同心球状に閉鎖した小胞 (vesicles) である。この 2 分子膜

Fig. 3. エマルジョンとリポソームの平衡と共存.
(TG としては triolein を用いた. 本文参照)

Fig. 5. phospholipase D による PC 2 分子膜の加水分解
1: PC のみ, 2: PC+18 モル% コレステロール, 3: PC+18 モル% ジグリセライド

に中性脂質が添加されるとどのような構造変化が起こるだろう。

TG, CE, Q_{10} や VEA などは PC 2 分子膜への溶解度が小さい。溶解度以上に添加された過剰の中性脂質は 2 分子膜から分離し、水中に中性脂質の液滴を形成する。油滴と水の界面張力 (界面エネルギー) は大きい。2 分子膜の PC が一部この界面に移動 (拡張, spreading) し単分子膜 (monolayers) を形成すると、そのエネルギーは低下して油滴は安定化される¹⁾。このようにして得られる中性脂質と PC による安定なエマルジョン分散系には、エマルジョン粒子と 2 分子膜 (すなわち、リポソーム粒子) が共存する。このことは実用化されている TG/PC-脂肪乳剤 (Intralipid) において広く実証されている⁹⁾。また PC/TG エマルジョンやこれを基本構造とする CM や VLDL の体内異化において、エマルジョン表面単分子膜と 2 分子膜の動的平衡関係は重要である⁷⁾。

Fig. 3 に TG/PC エマルジョン粒子と PC リポソーム

Fig. 4. 脂質あるいは脂質混合物の親水性-親油性バランスと水中に形成される液晶構造

ムの共存を示した。リポソーム 2 分子膜とエマルジョン単分子膜中に溶解している TG 量は、それぞれ、3 および 5 モル% である。筆者等は、人工のエマルジョンのみならず、CM や VLDL でも粒子表面の TG 濃度が一定に保たれるのは、この 2 分子膜と表面単分子膜の (動的) 平衡によることを示した⁸⁾。

TG/PC エマルジョンを動物体内 (血漿) に投与すると、血管表皮細胞での TG の消化吸収 (lipolysis) と残存粒子の肝細胞による取り込みの 2 つの過程により異化される。lipolysis により emulsion 内部の TG が減少して過剰の表面膜が 2 分子膜として析出するが、血漿中のアポリポ蛋白 A-1 の作用によりミセル化 (HDL 化) する⁹⁾。また、エマルジョンにコレステロールやそのエステルを添加すると 2 つの過程に大きな影響を与える¹⁰⁾。これらの結果は天然のリポ蛋白 CM や VLDL にも見い出される現象と密接な関係があり、高脂血症の研究や薬物送達システムへの人工のエマルジョンの利用に大きな期待がもたれている。

4. ジグリセライドとモノグリセライド

ジグリセライド (DG) とモノグリセライド (MG) は PC 2 分子膜にかなりよく溶ける。相当量の DG や MG が添加されても 2 分子膜からの分離は起こらない。Fig. 4 に示されるように、脂質あるいは脂質混合物が水中に形成する液晶の構造は、その親水性-親油性バランスによって決定される¹⁾。バランスのとれた PC は 2 分子膜やこれがつみかさなった lamellar 相を形成する。PC より脂肪酸を 1 分子除いた lyso-PC は親水性が高くミセルを形成する。また PC 2 分子膜に TG を加えても、その溶解度は 3 モル% で低く、2 分子膜構造は維持される。前述したように過剰の TG はエマルジョンの内部液滴を形成する。

Fig. 6. レシチン (PC) 2 分子膜に中性脂質 (NL) が添加されたときの構造変化
NL: 図 2 の B 型脂質

一方, DG は PC2 分子膜によく溶け, その親油性を高める. 30% 以上添加されると 2 分子膜は逆ヘキサゴナル (H_2) 構造に変化する³⁾. 親油基が外側に向けた逆トポロジーをもつ H_2 はその疎水性のため水中に安定に分散しにくい. 2 分子膜から H_2 に変化する途中で多様な構造の乱れや変化が存在することが指摘されているが, その詳細ははっきりしていない. 筆者等は PC 2 分子膜に対するホスホリパーゼ D (PLD) の活性が TG の添加により著しく増加することを見出した. コレステロールの添加は PLD の活性にほとんど影響しない⁴⁾ (Fig. 5 参照). PLD の活性化は膜による情報伝達機能と関係し大きな注目をあびている. PLD の活性化は, 2 分子膜中の基質 PC のリン酸基周辺の運動性が DG の添加により増大することと関係している.

モノグリセリド MG も DG と同様に PC 2 分子膜によく溶ける. MG の添加は 2 分子膜を親油性に傾け, 逆トポロジーの cubic phase を生成させる⁵⁾. この構造は Fig. 4 の 2 分子膜 (lamellar) と H_2 構造の中間に

Fig. 7. Q_{10} -PC 混合物の水中分散粒子
(a) $Q_{10}/PC = 5/5$, 平均粒径 65 nm
(b) $Q_{10}/PC = 7/3$, 平均粒径 75 nm

位置する. 親油基が外側に向けた逆トポロジーをもつこれらの構造は生物物理学的にも重要であるが, その研究はあまり進展していない. MG が PC 2 分子膜に添加されると, マルチラメラリポソームから微小リポソームの変化がおりやすくなる¹¹⁾. 同様のことはレチノール (ビタミン A)-レシチン系でも見出せる. Fig. 6 に示すように疎水性 (親油性) の高い MG が非対称的に 2 分子膜の表裏に分布すれば, 膜のヴェジクル化がおりやすくなる. 微小ヴェジクル (SUV) 表裏での中性脂質の非対称性は α -tocopherol (VE) 含有系で知られている¹²⁾.

5. レシチンとユビキノ 10 による エマルション形成

ユビキノ 10 (Q_{10}) は動物細胞のミトコンドリアのエネルギー代謝, 酸化的リン酸化の電子伝達にも不可欠の中性脂質であり, 種々の機能向上や回復にも有効である. Q_{10} と PC の単分子膜-2 分子膜平衡, DSC や NMR などの測定により, PC 2 分子膜には Q_{10} は 5% しか溶解しないことがわかった. 過剰の Q_{10} は, TG の場合同様に, 分離して水中に油滴を形成する. 油滴は PC 単分子膜に覆われ, エマルション粒子として安定化される. この安定なエマルション粒子は PC の 2 分子膜 (すなわち, liposomes) と共存する¹³⁾. (室温付近では Q_{10} は固体であり, エマルション粒子よりもむしろサスペンション粒子と呼んだ方がよいかもしれない).

Fig. 8. エマルジョン粒子とリポソーム粒子を区別する

Fig. 7 は PC/ Q_{10} がモル比で 5/5 および 3/7 で調製された粒子の陰染色電顕写真である。それぞれ、平均粒径が 65 と 75 nm の安定な微粒子が形成される。Freeze-fracture 電顕で観察すると、内部に Q_{10} のコアを持つサスペンション粒子と中空のリポソーム粒子の混合物であることがわかった。

Fig. 8 にエマルジョン構造と 2 分子膜リポソーム構造の判別法を示した。70 mM の蛍光色素カルセイン水溶液で PC リポソーム (vesicles) を調製すると色素はリポソーム内水相に取り込まれる。ゲルろ過法によりリポソームと溶液中の色素は分離される。次に界面活性剤を用いてリポソームを破壊すれば、内水相の色素は外にも希釈される。70 mM ではカルセインは自己消光のためにほとんど蛍光を発光しないが、希釈されると強い蛍光を放出する。これを利用してリポソームに trap された水相の体積を評価することができる。PC 1 モル当りのリポソームが内部に取り込む水相の体積は small unilamellar vesicles (SUV) では 0.4~0.5 l である。 Q_{10} が粒子内をうめ、エマルジョン粒子が増大するとトラップ体積は小さくなる。

他方、水溶液中でリポソームを形成し、次に外側より常磁性イオン (Pr^{3+} など) を加えると、このイオンは 2 分子膜を透過できないので、外側の PC とのみ相互作用する。 Pr^{3+} は NMR の化学シフトを変化させ、内側と外側の PC が別々に測定できるようになる。内水相のないエマルジョン構造の粒子が中性脂質 Q_{10} の添加によりふえると、内側に存在する PC 分子の割合が低下する。この結果に基づいて(エマルジョン)/(リポソーム)の値を求めると PC/ Q_{10} = 5/5 ではほぼ 1 となる。

この値は trap 率から得られる値と一致する¹³⁾。このように PC/ Q_{10} 系は PC/TG 系とよく似た挙動を示す。同様のことは PC/ビタミン A エステル、あるいは、PC/ビタミン E エステル系などにも見いだされる。

PC/ Q_{10} エマルジョン粒子を動物体内に投与(血漿中への投与)すると、PC/TG や PC/CE 系と同様に肝細胞によく取り込まれる。しかし、 Q_{10} は他に心臓にも強い親和性を持つ事が知られている¹⁴⁾。この親和性は、血漿中の Q_{10} 結合蛋白が Q_{10} をエマルジョン粒子より抜きとって心臓に送達する為か、 Q_{10} 含有粒子自身が心臓細胞に親和性をもっているためか明らかではない。筆者等の最近の研究結果では後者であることが示唆されている。表面にわずかに露出している Q_{10} により TG や CE とは異なる血漿蛋白選択性をエマルジョンがもつのであろう。なお、 Q_{10} は体内(血漿中)では CM や VLDL などのリポ蛋白粒子に運ばれて移動している。

6. メナキノン 4 によるレシチン 2 分子膜の構造変化

メナキノン 4 (menaquinone-4, MQ_4 , 別名ビタミン K_2) は血友病などの治療効果をもつ有用な中性脂質である。 MQ_4 と PC 混合系の単分子膜と 2 分子膜平衡の測定から、PC 2 分子膜には MQ_4 は約 20% 程度まで溶解することがわかった¹⁵⁾。したがって、PC と MQ_4 の混合物を水中で分散してもエマルジョン粒子は生成しにくい。実際、分散された PC/ MQ_4 粒子は内水相を持つリポソームになりやすい。20 モル%以上の過剰の MQ_4 は 2 分子膜より分離するが、これには PC が約 10 モル%取り込まれており逆ミセル構造 (Fig. 4 参照) を形成する。X 線小角散乱測定により、この逆ミセルが密に充填した cubic 相の形成が示唆されている¹⁴⁾。

さて、PC 2 分子膜に 20% の中性脂質 MQ_4 が取り込まれると、膜の親水性-親油性バランスは後者に傾き、Fig. 9 や Fig. 10 で見られる irregular な構造が生成される。PC/ MQ_4 = 2/8 の multilamellar リポソームの 2 分子膜中に、直径が約 25 nm のミセル状の intrabilayer particles が観察される (Fig. 9)。PC のみのリポソームではこのような構造は見つけられない。同じサンプル中の別の粒子に焦点をあわせると、200~250 nm のリポソーム内に約 20 nm の SUV が点在するのが見られる (Fig. 10)¹⁵⁾。Fig. 10 の SUV は Fig. 9 の

Fig. 9. MQ₄-PC 混合物リボソームの不規則構造 1
MQ₄/PC=8/2, 内部の 2 分子膜に intrabilayer particles が観察される.

intrabilayer particles が前駆体となって生成したものと考えられる。中性脂質による 2 分子膜の irregular 構造形成は Fig. 6 で説明される。PC の分子は親水性-親油性バランスがとれており、水中に 2 分子膜を形成する。親油性が高く 2 分子膜への溶解性が大きい中性脂質が添加されると、膜は湾曲し、その凹面に濃縮されやすい。これが進むと、Fig. 9 のような intrabilayer particles が形成される。この粒子の内部構造、すなわち逆ミセルが密に充填すれば逆ヘキサゴナル相（棒状逆ミセル集合体, H_{II}）、あるいは逆キュービック相（球状逆ミセル集合体）が生成する。また、この particles がバラバラに切り離されると、Fig. 10 ような小ベシクル化（2 分子膜の fragmentation）がおこる¹⁾。

同様な小ベシクル化はモノグリセリド (MG) やレチノールによっても誘導されることは前述した。

7. 結 論

a. レシチンあるいはレシチンとコレステロール 2 分

Fig. 10. MQ₄-PC 混合物リボソームの不規則構造 2
MQ₄/PC = 8/2, 内部の多重 2 分子膜はフラグメント化し、多数の SUV が観察される.

子膜にトリグリセリド、またはコレステリルエステルを添加するとエマルション粒子が生成する。エマルション粒子は 2 分子膜のリボソーム粒子と共存する。これらのエマルション粒子は動物血漿中のリボ蛋白モデルと見ることができる。エマルション中のコレステロールやそのエステル含量により、血管表皮細胞でのトリグリセリドの消化吸収、肝細胞による粒子取り込みが大きく影響される。

b. ユビキノン 10, α -トコフェロールエステルやレチノールエステルも同様にレシチンとエマルション構造を形成する。ユビキノン 10 含有エマルションは動物体内で特異的な挙動を示す。

c. ジグリセリド、メナキノン 4 や α -トコフェロールはレシチン 2 分子膜に大量に溶解、逆ヘキサゴナル構造などの逆トポロジー構造を形成する。これ等の中性脂質は生体膜で情報を伝達に関与すると考えられている。

2 分子膜中のジグリセライドは種々の phospholipase を活性化する。

d. これらの脂質分子は膜, リポ蛋白間で動的平衡状態にあり, その動きを支配するのは物理化学ポテンシャルである。

文 献

- 1) T. Handa and M. Nakagaki : *Adv. Colloid Interface Sci.*, **38**, 45 (1992). 半田哲郎 : 薬学雑誌, **111**, 410 (1991)
- 2) J.C.L. Mamo, A. Bowler, C.L. Elsegood and T.G. Redgrave : *Biochim. Biophys. Acta*, **1081**, 241 (1991)
- 3) S. Das and R.P. Rand : *Biochemistry*, **25**, 2882 (1986)
- 4) I. Yamamoto, T. Mazumi, T. Handa and K. Miyajima : *Biochim. Biophys. Acta*, **1145**, 293 (1993)
- 5) H. Gutman, G. Arvidson, K. Fontell and G. Lindblom : "Surfactant in Solution" (K. Mittal and B. Lindman, eds.) Vol. 1, p. 143, Plenum Press, New York (1984)
- 6) P. K. Hansrain, S. S. Davis, M. J. Groves : *J. Parent. Sci. Tech.*, **37**, 145 (1983), M. Badr, D. R. Kodali and T. G. Redgrave : *J. Colloid Interface Sci.*, **113**, 414 (1986)
- 7) A. R. Tall D. M. Small : *Adv. Lipid Res*, **17**, 1 (1980)
- 8) T. Handa, H. Saito and K. Miyajima : *Biochemistry*, **29**, 2884 (1990)
- 9) T. Handa, H. Saito, I. Tanaka, A. Kakee, T. Tanaka, and K. Miyajima : *Biochemistry*, **31**, 1415 (1992)
- 10) 半田哲郎, 江口裕子, 宮嶋孝一郎 : 第 34 回日本脂質生化学研究集会要旨 p. 199 (1992), 投稿中
- 11) C-C. Yin, P. Schurtenberger, E. Wehrli, F. Palttauf and H. Hauser : *Biochim. Biophys. Acta*, **1070**, 33 (1991)
- 12) F. Bellemare and M. Fragata : *J. Membrane Biol.*, **58**, 67 (1981)
- 13) T. Handa, Y. Asai, K. Miyajima, Y. Kawashima, M. Kayano, K. Ida and T. Ikeuchi : *J. Colloid Interface Sci.*, **143**, 205 (1991)
- 14) T. Yuzuriha, M. Takano and K. Katayama : *Biochim. Biophys. Acta*, **759**, 286 (1983), M. Takada, T. Yuzuriha, K. Katayama, C. Yamato. and N. Katayama : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **31**, 115 (1985)
- 15) T. Handa, Y. Asahi, H. Komatsu, and K. Miyajima : *J. Colloid Interface Sci.*, **153**, 303 (1992) (受付 1992 年 12 月 10 日)

＜学会だより＞

'93 新素材展 (第 9 回)

〔機能材料・部品, 新用途, 加工成形技術の

R & D マーケティングショー〕

会 期 : 1993 年 5 月 18 日 (火) ~ 21 日 (金) 4 日間

午前 10 時 ~ 午後 5 時 (最終日 午後 4 時終了)

会 場 : 日本コンベンションセンター・幕張メッセ

(千葉県千葉市美浜区中瀬 2-1)

会場面積 : 27,000 m²

展示小間 : 1,200 小間予定 (1 小間 9.0 m²)

入場料 : 1,000 円・団体料金 (20 名以上) 700 円

対 象 : 官公庁, 企業の商品開発・設計, 材料製品化戦略の意志決定者 (経営者・幹部, 経営企画部門, 購買・資材部門, 生産・製造部門, 技術・研究・開発部門など)

主 催 : 日本経済新聞社

材料連合フォーラム (会長 斉藤進六東京工業大学名誉教授)

後援 (予定) : 通商産業省, 外務省, 文部省, 科学技術庁, 工業技術院, 日本商工会議所, 経済団体連合会, 日本貿易振興会 (順不同)

協力 (予定) : 日経 BP 社, テレビ東京

協賛 (予定) : 日本膜学会ほか