●特集 薬用外でのリポソームの利用

機能性高分子を表層に有するリポソームの特性解析

田川 幸二・北野 博巳

富山大学工学部 ☎ 930-8555 富山市五福 3190

Characterization of Liposomes Which Have Functional Polymer Chains on Their Surfaces

Koji Tagawa and Hiromi Kitano

Department of Chemical and Biochemical Engineering, Toyama University
Gofuku 3190, Toyama 930-8555, Japan

Liposomes are frequently used as model systems to clarify diverse functions of biomembranes. We have been introducing various functional polymer chains on the surface of liposomes by using a lipophilic radical initiator. In this review, our recent studies concerning specific molecular recognition on liposome surfaces were introduced.

Key words : liposome/sugar/enzyme/lectin/lipophilic radical initiator/molecular recognition

1. はじめに

多細胞生物では、それぞれの細胞が他の細胞と特異的に認識しあい、様々な相互作用をすることによって1つの個体を構築している。従って、細胞間の認識および相互作用は、発生や分化、成長などの生命現象において必須過程であるといえる。細胞間の認識は、細胞膜上に存在する複数の反応系が複雑に絡み合った後、起こると考えられている¹⁾。

これら細胞膜表面での諸現象を理解するには、生体膜由来のリン脂質によって形成されるリポソームや単分子膜、さらには Langmuir-Blodgett (LB) 法などによって調製される累積膜に機

能性分子を組み込み、解析を行うことが簡単な手段である²⁾。

本総説では、リポソーム表面に機能性高分子を導入することにより、生体内で起こっている特異的分子認識現象を解析することを試みた筆者らの研究や、他の研究者らの研究について紹介していきたい。

2. 脂質型開始剤を用いた機能性高分子の調製

筆者らは、これまでにアゾ型の開始剤を用いて様々な機能性高分子を調製し、膜表面での機能評価を行ってきた³⁻¹⁰⁾。この開始剤は、疎水性の大きなアンカーを有しているため、高分子を膜の

Fig. 1 Preparation of functional amphiphiles using DODA-501

親水部に固定することができる。

筆者らが主として用いたアゾ型の開始剤 (DODA-501 (Fig. 1)) は、4,4'-アゾビス (4-シアノ吉草酸) を *N*-ヒドロキシスクシンイミドの活性エステルとした後、ジオクタデシルアミンと反応させて調製する。これを用いて、各種機能基を側鎖として担持したモノマーを重合させることにより、容易に両親媒性の機能性高分子を調製することが可能である。筆者らは、生物学的情報を有すると報告されている糖鎖に注目し、様々な新規糖担持脂質を調製した。

3. 膜表面での糖鎖認識

筆者らは、膜表面に各種糖残基を有するリポソームを調製した後、レクチンとの相互作用^{4~6, 9, 10)}、酵素による触媒効果⁷⁾、マクロファージによる取り込み⁹⁾について検討を行った。

3.1 レクチンとの相互作用

細胞そのものや天然に存在する糖脂質を含むリポソームと同様に、Fig. 1 で示した糖担持脂質を含むリポソームにレクチンを加えると、溶液の濁度が上昇した (Fig. 2)。このレクチンによる特異的認識は、リポソーム中の糖担持脂質の重合度お

Fig. 2 Effect of concentration of Con A on the turbidity change after the addition of Con A to the liposome suspension at 25°C, 350 nm

[Liposome] = 50 μg of lipid/mL. Content of mannose-carrying amphiphile = 20 wt. %

(○) DHDG-Man which has one mannose residue, (△) DODA-PMHMan DP=9, (◆) 18, (●) 23, (■) 25

よび含量に大きく依存した¹⁰⁾。

また筆者らは、エバネッセント波を用いる多重内部反射蛍光法を用いてレクチンを吸着させた界面への糖担持リポソームの結合過程について速度論的に検討を行った⁴⁾。エバネッセント波は、屈折率の異なる2種類の物質の界面で光が全反射する際に、境界面から漏れ出す光のことであり、これを用いて、固体表面に吸着しているか、または固体表面近傍に存在する蛍光物質を検出することができ、様々な吸・脱着現象をリアルタイムで測定することが可能となる。

レクチンで表面を修飾したキュベットに、蛍光標識した糖担持リポソーム懸濁液を注入すると、蛍光強度が急激に増加した。この蛍光強度の初期勾配から、レクチンを修飾した界面への糖担持リポソームの結合速度を求めることができる。また、リポソームが拡散によってキュベット界面に衝突し、必ず結合が起こるとしたときの結合速度の理論値 (式(1)) と実測値の比 *R* 値 (式(2)) は、物質が界面へ衝突した際に結合した確率を示している。

Fig. 3 Effect of mixing ratio of DDPC (polymerizable phospholipid) and DODA-PMEGlc on the R value
(●) DP=83, (○) 13, (□) 4

$$(dCs/dt)_{t_{heor}} = C_0(D/\pi t)^{0.5} \quad (1)$$

$$R = (dCs/dt)_{exp} / (dCs/dt)_{t_{heor}} \quad (2)$$

実験の結果、糖担持脂質（重合度；83）の含量が20重量%のリポソーム（直径1300~1400 Å）では、R値は0.65となった。この値は、レクチンが吸着した界面に衝突した糖担持リポソームのうち65%が、レクチンと結合したことに計算上ではなる。一般に、リポソーム表面や糖鎖部分さらにレクチンの結合部位は強く水合されており、レクチンの糖残基への結合に際して脱水和を必要とすることから、これほど迅速に結合するとは考えにくい。しかし、リポソーム中の糖担持脂質の含量を減らしたり、糖担持高分子鎖を短くすることによりR値が大きく減少したことから（Fig. 3）、レクチンを修飾した表面と糖担持リポソームの長い糖鎖とが「ジッピング」を起こすことにより、効率的な結合が生じたものと考えられる。

さらに、この新規糖担持脂質とレクチンの会合

Table 1 Association constants (K_a) for the complexation of Con A with mannose-carrying amphiphiles and sugar derivatives at 25°C

amphiphiles	K_a (M^{-1})
DODA-PMHMan (DP=18)	2.2×10^6
DODA-PMPMan (DP=18)	0.9×10^6
DODA-PMEPMan (DP=17)	0.3×10^6
sugar derivative	K_a (M^{-1}) ¹³⁾
α -Methyl D-Glucopyranoside	2.0×10^3
α -Methyl D-Mannopyranoside	8.2×10^3
Oligosaccharide*	1.4×10^6

定数および熱力学パラメーターについても検討を行った¹⁰⁾。レクチンと糖担持脂質の会合定数は、単糖の会合定数よりはるかに大きく、枝分かれしたオリゴ糖と同程度の値を有しており（Table 1）、Lee らによって提唱された“クラスター効果”^{11, 12)}がこの系にも現れていることが示唆された。

熱力学パラメーターについては、 ΔH の値が負の大きな値になればなるほど、レクチンと糖残基の間で生じる水素結合などの相互作用が強くなることを意味し、 ΔS の値が正の大きな値をとれば、レクチンと糖残基が結合する際に邪魔となる水分子の排除を意味していると考えられている^{14, 15)}。

Table 2の結果からは、筆者らが用いた系でのレクチンによる特異的認識現象が、 ΔH 支配というよりは、 ΔS 支配つまり脱水和 ($\Delta S > 0$) が主な駆動力となっていることがわかる（Table 2）。

Table 2 Thermodynamic parameters for the complexation of Con A with mannose-carrying amphiphiles

amphiphiles	ΔG° (kJ/mol)	ΔH° (kJ/mol)	ΔS° (J/mol·K)
DODA-PMPMan (DP=18)	-33.8	-22.8	37
DODA-PMHMan (DP=18)	-36.0	-30.1	20
DODA-PMEPMan (DP=17)	-30.6	-15.1	52

Fig. 4 Effect of the degree of polymerization of DODA-PMEGal on K_m and k_{cat}/K_m values at 25°C
[Galactose Oxidase]=0.25 units/ml

3.2 ガラクトースオキシダーゼによる酸化反応

次に、糖を基質とする酵素の脂質膜上での反応について検討を行った結果⁷⁾ について紹介したい。ガラクトースの一級水酸基を酸化するガラクトースオキシダーゼとガラクトース担持リボソームとの間の反応では、糖担持脂質の重合度が増加するに伴い酵素と基質の親和性を示す K_m 値は大きく減少し、それとともなって触媒効率 k_{cat}/K_m は増加した (Fig. 4)。ホモポリマーを用いた系についても程度は小さいが、同様な傾向が見られることから、糖残基が高分子鎖上や膜表面に連続して存在することが酵素の触媒効率を高めているといえる。さらに、重合度の増加に伴い糖鎖の

Fig. 5 van't Hoff plot of enzymatic reaction for various galactose residues.
In HEPES buffer (10 mM, pH 6.5).
[Galactose Oxidase]=0.25 and 0.05 units/ml for liposomes and free galactose, respectively
Content of DODA-PMEGal (DP=8.5)=20 wt. %
(○) polymerized liposome, (●) unpolymerized liposome, (◐) free galactose

末端に存在する糖残基がリボソーム表面から離れることも、親和性が増加することを示唆している。また、リン脂質の炭化水素要因である鎖同士を光架橋した膜を用いると、膜の相転移温度 (18°C) が消失し、温度が上昇するに伴い酵素との親和性が徐々に減少した (Fig. 5)。一方、膜を架橋しなかった系では、相転移温度を境にして親和性が劇的に変化していることから、膜の流動性が変化するとガラクトースオキシダーゼによる酸化反応が、大きく左右されることが明らかとなった。

3.3 マクロファージによる捕食

次に、ガラクトースに対するレセプターを細胞膜表面に有すると報告^{1) 6)} されているマウスの腹腔マクロファージを用いて、エンドサイトーシスの検討⁹⁾ を行ったところ、上で紹介した糖担持リボソームは、レクチンや酵素により強く認識されたにもかかわらず、マクロファージとは特異的な反応を示さなかった。リボソーム上に導入した糖担持テロマー鎖部分は、まっすぐに伸びているわけではなく、分子内および分子間水素結合により幾分絡まっている状態にある。そのため、標識部

Fig. 6 Chemical structure of DPPE iniferter

位である糖残基を細胞の受容体が認識するには、立体的に困難であったのではないかと考えられる。

3.4 外部刺激応答

筆者らは、先に述べた脂質型ラジカル開始剤に加えて、大津ら（大阪市立大）によって開発された iniferter 法^{17~20)}を用いた光開始剤²¹⁾ (Fig. 6) や脂質型の連鎖移動剤²²⁾等を用いて、pH や温度等の外部刺激に応答する機能性高分子を調製し、これをリポソームに組み込んで機能評価を行った。pH 応答性を付与する際には単量体として、アクリル酸³⁾、メタクリル酸²²⁾、*N*-メタクリロイル-D, L-ホモシステインチオラクトン²³⁾を用い、温度応答性の付与には、*N*-イソプロピルアクリルアミドを用いた²²⁾。これらのリポソームでは、pH を下げるにより、膜表面に存在する機能性高分子が、リン脂質と水素結合したり膜内部に進入するために脂質のパッキングが乱れ、内部の封入物質を流失すること^{3, 22, 23)}、また温度上昇により膜表面が親水性から疎水性へと変化することにより、凝集するなどの応答性を示すこと²¹⁾が判明した。さらに、機能性モノマー残基を高分子鎖中にブロックで配置すると応答機能を発揮することができるが、ランダムに配置すると、その機能が大きく損なわれることも示された²¹⁾。

同様に、東（同志社大工）らは、マンガンのカルボニル化合物 ($\text{Mn}_2(\text{CO})_{10}$) と脂質との触媒反応を利用して pH に応答する単分子膜を調製している²⁴⁾。さらに、彼らは 2 分子膜に組み込んだ新規脂質型光開始剤や連鎖移動剤に光照射すると、穏和な条件下で分子量が制御された高分子を得ることができると報告している²⁵⁾。

4. 様々な高分子で修飾したリポソーム

様々な高分子で表面を修飾したリポソームを用いて貪食細胞やレクチンなどとの相互作用についても研究が、今までに数多く行われている。

デキストランやマンナンなどの多糖で修飾したリポソームと特定臓器に存在する貪食細胞との相互作用について砂本（京大院工）らが興味深い検討を行っている^{26~28)}。また、PEG でリポソーム表面を修飾し貪食細胞との相互作用や生体内での挙動についても研究されている^{29~33)}。

5. おわりに

脂質型ラジカル開始剤を用いて得られた高分子担持脂質を含む膜の機能のなかで、主に分子認識を模倣した系について述べてきた。このような機能を利用することにより、ドラッグデリバリーシステム (DDS) におけるターゲティングデバイスとして利用できることから、最近注目を浴びつつある。さらに、膜が持つ機能の幾つかを組み合わせることにより様々な方面に応用することができることから、膜機能を解明する基礎的な研究とともに、その機能の応用を目指した研究が、今後さらに発展することを期待したい。

文 献

- 1) 曾根三郎, 六浦聖二, 小河原光正, 螺良英郎: 日本臨床免疫 Handbook pp 845-853 (1984).
- 2) H. Ringsdorf, B. Schlarb, J. Venzmer: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **27**, 113-158 (1988).
- 3) H. Kitano, Y. Akatsuka, N. Ise: *Macromolecules* **24**, 42-46 (1991).
- 4) H. Kitano, K. Ohno: *Langmuir* **10**, 4131-4135 (1994).
- 5) H. Kitano, K. Sohda, A. Kosaka: *Bioconjugate Chem.* **6**, 131-134 (1995).
- 6) K. Ohno, K. Sohda, A. Kosaka, H. Kitano: *Bioconjugate Chem.* **6**, 361-366 (1995).
- 7) K. Ohno, H. Kitano: *Bioconjugate Chem.* **9**, 548-554 (1998).
- 8) H. Kitano, M. Kuwayama, N. Kanayama, K. Ohno: *Langmuir* **14**, 165-170 (1998).

- 9) T. Kawaguchi, K. Tagawa, F. Senda, T. Matsunaga, H. Kitano : *J. Colloid Interface Sci.* **210**, 290-295 (1999).
- 10) K. Tagawa, N. Sendai, T. Kawaguchi, K. Ohno, T. Matsunaga, H. Kitano : *Bioconjugate Chem.* in press.
- 11) D. T. Connolly, R. R. Townsend, K. Kawaguchi, W. R. Bell, Y. C. Lee : *J. Biol. Chem.* **257**, 939-945 (1982).
- 12) R. T. Lee and Y. C. Lee : In "Neoglycoconjugates : Preparation and Application", Y. C. Lee, R. T. Lee, Eds., pp. 23-50, Academic Press, San Diego (1994).
- 13) D. K. Mandal, N. Kishore, C. F. Brewer : *Biochemistry* **33**, 1149-1156 (1994).
- 14) F. P. Schwarz, K. B. Puri, A. Surolia : *J. Biol. Chem.* **266**, 24344-24350 (1991).
- 15) F. P. Schwarz, K. B. Puri, R. G. Bhat, A. Surolia : *J. Biol. Chem.* **268**, 7668-7677 (1993).
- 16) J. Hasensler, F. Schuber : *Biochim. Biophys. Acta* **946**, 95-105 (1988).
- 17) T. Otsu, M. Yoshida : *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **3**, 127-133 (1982).
- 18) T. Otsu, K. Yamashita, K. Tsuda : *Macromolecules* **19**, 287-290 (1986).
- 19) T. Otsu, T. Matsunaga, A. Kuriyama, M. Yoshioka : *Eur. Polym. J.* **25**, 643-650 (1989).
- 20) T. Doi, A. Matsumoto, T. Otsu : *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.* **32**, 2911-2918 (1994).
- 21) H. Kitano, M. Chibashi, S. Nakamata, M. Ide : *Langmuir* **15**, 2709-2713 (1999).
- 22) H. Kitano, Y. Maeda, S. Takeuchi, K. Ieda, Y. Aizu : *Langmuir* **10**, 403-406 (1994).
- 23) H. Kitano, H. Wolf, N. Ise : *Macromolecules* **23**, 1958-1961 (1990).
- 24) N. Higashi, H. Shiba, M. Niwa : *Macromolecules* **22**, 4650-4652 (1989).
- 25) N. Higashi, T. Adachi, M. Niwa : *Macromolecules* **23**, 1475-1480 (1990).
- 26) J. Sunamoto, K. Sakai, T. Sato, H. Kondo : *Chem. Lett.* **10**, 1781-1784 (1988).
- 27) J. Sunamoto, T. Sato : *J. Chem. Soc. Jpn.* **3**, 161-173 (1989).
- 28) 砂本順三 : *ファルマシア* **21**, 1229-1235 (1985).
- 29) A. L. Klivanov, K. Maruyama, V. P. Torchilin, L. Huang : *FEBS Lett.* **268**, 235-237 (1990).
- 30) G. Blume, G. Cevc : *Biochim. Biophys. Acta* **1029**, 91-97 (1990).
- 31) J. Senior, C. Delgano, D. Fisher, C. Tilcock, G. Gregoriadis : *Biochim. Biophys. Acta* **1062**, 77-82 (1991).
- 32) H. Ishiwata, A. Vertut-Doi, T. Hirose, K. Miyajima : *Chem. Pharm. Bull.* **43**, 1005-1011 (1995).
- 33) A. Vertut-Doi, H. Ishiwata, K. Miyajima : *Biochim. Biophys. Acta* **1278**, 19-28 (1996).

(受付 1999年4月5日 掲載決定 4月15日)