NMR による脂質膜中の薬物の「運動」の解析

Mobility of Drugs in Lipid Membranes by NMR

吉井 範行

姫路獨協大学 薬学部
〒670-8524
兵庫県姫路市上大野 7-2-1

Noriyuki YOSHII
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Himeji
Dokkyo University, 7-2-1, Kamiohno,
Himeji 670-8524 Japan

岡村 恵美子

姫路獨協大学 薬学部
〒670-8524
兵庫県姫路市上大野 7-2-1

Emiko OKAMURA
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Himeji
Dokkyo University, 7-2-1, Kamiohno,
Himeji 670-8524 Japan

論文要旨：生体膜を構成する分子や膜のなかの薬物の「運動性」は、薬物の膜輸送機構を明らかにするための重要な知見となる。膜は生理的条件下で常に揺らいでおり、膜のなかの薬物の運動を多かれ少なかれ支配している。筆者らは、高分解能溶液 NMR とパルス磁場勾配 (PFG) 法を組み合わせ、膜中の薬物や脂質分子の運動を *in situ* で観測し、定量化する方法を独自に開発した。生体膜モデルとして卵黄レシチンの一枚膜ベシクル (large unilamellar vesicle, LUV; 直径 100 nm) を用いて、膜のなかの薬物の拡散運動や膜への結合と解離のキネティクス、膜への結合量を明らかにした。また、通常の一次元 NMR 測定と PFG NMR 測定を使い分けることにより、さまざまな速さの結合・解離運動の測定が可能となることを見出した。なお、ここではモデル薬物として 5-フルオロウラシルとフッ素化ビスフェノール A を用いた。

Abstract: Mobility of drugs and biomembrane constituents is a key to elucidate the membrane transport mechanism in the cell. Lipid bilayer membrane is a dynamic structure where molecules are always fluctuating under physiological conditions. The mechanism of drug transport is related to the molecular dynamics in such soft, fluid membrane interface. To gain insight into molecular movements in membranes, we develop a noninvasive method to monitor dynamic properties of drugs and lipid components in membranes by applying multinuclear high-resolution solution NMR in combination with the pulsed-field-gradient (PFG) technique. We have quantified the diffusivity, the kinetics of membrane binding, and the bound fraction of the drug *in situ* by using large unilamellar vesicles of egg phosphatidylcholine as model cell membranes. The combination of 1D and PFG NMR serves to quantify the kinetics of membrane binding where the bound and the free components are unable to distinguish because of the rapid exchange on the NMR timescale. A small-sized 5-fluorouracil and fluorinated bisphenol A are used as a model drug.

Key words: NMR, pulsed field gradient method, mobility, diffusion, kinetics of binding

1 はじめに

生体膜を構成するさまざまな分子や膜のなかの薬物の「運動性」は、薬物の膜輸送機構を明らかにするために、そして膜輸送の制御を行うために重要な知見となる。分子の動きは、さまざまな物理化学的方法を用いて知ることができ¹⁾、このうち NMR は、1) 調べたい原子サイトを選択的に識別することができる、2) ピコ秒から秒レベルにおよぶ幅広い時間スケールの動的情報が得られ

る、3) プローブなどの助けを借りることなく、試料をそのままの状態 (非破壊的に) 測定することができるなど、生きたままの分子の情報をそのまま取りだせる点で、非常に魅力的である。一方、NMR 法は、これまで感度の点で劣っていた。ところが最近の装置の格段の進歩により、核種をエンリッチしなくとも、数十 μM 、場合によってはそれ以下の濃度の定量的な運動性の測定が可能となるまでに感度が向上した。それにともない、他の方法では識別することができないようなわずかな変化を NMR で検知することが可能になってきた。このような状況のなかで、NMR を用いて膜のなかの分子のさま

連絡者：吉井範行
E-mail: yoshii@himeji-du.ac.jp

ざまな動きを探ろうという試みが、盛んになりつつある。

2 膜のなかの分子の運動と NMR

膜の構造的なゆらぎや膜輸送などに関連した分子の動きを理解するためには、膜内における分子の並進拡散(側方拡散)を観測するのがよい方法である。分子の並進拡散は、パルス磁場勾配 NMR 法²⁾を用いて捉えることができる。この方法自体は新しいものではなく、すでに1960年代に最初の測定が行われている。もっとも、これまでは、溶液やミセル系における拡散過程が NMR 研究の中心であり、脂質二分子膜や細胞膜など、異方的で複雑な膜環境のなかにおける分子の拡散過程の解析は、もっぱら、蛍光プローブを用いた測定に頼らざるを得なかった。蛍光プローブ法は感度の高い方法であるが、計測されるのはあくまでもプローブで標識された分子の振る舞いである。薬物などの膜輸送は、脂質二分子膜の動きにどの程度支配されるのか？ 脂質二分子膜内の分子の動きは、場所によって(局所的に)どのように異なるのか？ これらの疑問に答えるためには、膜のなかの特定の分子の動きに注目するだけでは十分でなく、膜のなかの複数の分子の動きを同時に観測する必要がある。このような目的に最もふさわしい測定法として、パルス磁場勾配 NMR 法が再び脚光を浴びている。本稿では、筆者らの成果を中心として、NMR による膜のダイナミクスと薬物の運動の研究の最前線を紹介したい。

3 NMR による薬物の識別

系に摂動を与えることなく、膜に結合した薬物とバルク中にある薬物を同時に観測することは容易でない。従来、系にプローブを導入するか、薬物にラベリングして測定が行われてきた。筆者らは、これらの方法を用いることなく、膜に結合した(bound)薬物と free の薬物の運動状態を *in situ* で同時に計測するために、新たな2つの NMR 測定手法を開発した。一つは、高分解能溶液 NMR 測定とパルス磁場勾配スピンエコー(PFG)法を組み合わせるものであり、もう一つは、膜脂質分子の濃度を広範囲に変化させて、一次元(1D)の高分解能溶液 NMR 測定を行うというものである。高分解能溶液 NMR 法は、分子・原子レベルの構造・ダイナミクスに関する情報を定量的に取得することができる優れた手法である。分子の揺らぎや動きを何ら制限することなく、自然のままの状態を捉えるこの方法の利点を活かして、筆者らは、固体 NMR ではなく「溶液 NMR による膜研究」を行っている。膜の自然な揺らぎと関係した薬物の運動状態や輸送のプロセスをそのままの状態を観測するためにも、高分解能溶液 NMR 法は好都合である¹⁾。また、

PFG 法は、分子の動的な性質の指標となる“拡散係数”を求める方法であり、これによって、分子の並進運動の大きさを定量化することができる²⁾。したがって、高分解能溶液 NMR と PFG 法を組み合わせることによって、薬物や膜を構成する分子の運動や拡散過程を、*in situ* で、それぞれ独立に捉えることが可能となる³⁾。PFG NMR 法、高分解能の 1D NMR 法を適切に使い分けることによって、膜のダイナミクスと薬物の運動を *in situ* で定量化することができるものと期待される。

4 膜のなかの薬物の拡散

膜のなかで薬物はどのように拡散していくのであろうか。膜のなかの拡散は、水中とどのように異なるのであろうか。筆者らは、抗がん剤として広く用いられている 5-フルオロウラシル(5FU, Fig. 1 (a)), および内分泌かく乱物質ビスフェノール A のフッ素置換体 F-ビスフェノール A (FBPA, Fig. 1 (b)) をモデル薬物に採用して、NMR による膜のなかの薬物の拡散の解析を試みた。その結果、NMR と PFG 法を組み合わせることにより、膜に結合した薬物と free の薬物を *in situ* で同時に定量し、薬物の結合量や膜のなかの拡散運動を明らかにすることができた⁴⁾。ここでは、生体膜のモデルとして、卵黄レシチン(EPC)の一枚膜ベシクル(LUV, 直径 100 nm)を用い、測定温度は、膜が液晶状態にある 293~313 K とした。いずれの薬物もフッ素原子を含むため、¹⁹F NMR を多用した。

最初に、5FU の水溶液(濃度 2~30 mM)にベシクル(EPC 濃度 40~50 mM)を加え、NMR 計測を行った⁴⁾。Fig. 2 に 5FU の 1D ¹⁹F NMR スペクトルを示す。水溶液中の 5FU のシグナルは、シャープな doublet として観測される(破線)。5FU の 5 位の F と 6 位の H 核間の J-coupling によるためである。一方、ベシクルが存在すると、Fig. 2 の実線のように、先に述べた doublet に加えて、新しくブロードな成分(図中の*)が現れる。新しく観測される成分(*)は、膜に結合した 5FU であると予想される。シグナルの帰属を確かめるために、

Fig. 1 Molecular structure of 5-fluorouracil (5FU) (a) and fluorinated bisphenol A (FBPA) (b).

Fig. 2 1D ^{19}F NMR spectra of 3 mM 5FU in the presence (solid line) and absence (dashed line) of EPC LUV⁴⁾. Asterisk shows a new peak that appears in the presence of the membrane.

Fig. 3 Attenuation of ^{19}F NMR signals of 2 mM 5FU in the presence of LUV under the magnetic FG (g) of 0.05, 0.15, 0.225, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50, 0.55, 0.60, 0.65, 0.70, 0.75, 0.80, 0.85, and 0.91 T/m (from left to right)⁴⁾. Here the rectangular FG pulses were applied with a time interval (Δ_{diff}) of 100 ms, with the gradient pulse width (δ) of 2 ms.

PFG 測定を行った。膜に結合した 5FU は膜中で運動が制限されるために PFG シグナルの減衰は遅い。一方、free の 5FU は運動が束縛されないために、バルク中で速く拡散する。このために、PFG シグナルは磁場勾配強度の増加に伴って free の成分が優先的に減衰するはずである。実際、5FU の PFG ^{19}F NMR シグナルは、Fig. 3 に示すように、磁場勾配強度 g が増加するに伴ってシャープな doublet が急激に減衰し、ブロードな成分が残った。 ^1H NMR においても同様であった。このことから 1D NMR スペクトル (Fig. 2) において新たに出現

したブロードな成分が膜に結合した 5FU, doublet が free の 5FU であることが確認された⁴⁾。

このように、運動性の違いを利用して、膜に結合した 5FU と free の 5FU を識別することができた。そこで、PFG NMR 測定から得られたシグナル強度 I に対して、Stejskal-Tanner の関係式⁵⁾

$$\ln \frac{I(g)}{I(0)} = -Dm^2 \left(\Delta_{\text{diff}} - \frac{\delta}{3} \right) \quad (1)$$

を用いて、膜に結合した 5FU, free の 5FU の拡散係数をそれぞれ算出した。ここで、 g は磁場勾配強度、 D は拡散係数、 Δ_{diff} は拡散時間、 $m = \delta \gamma g$ であり、 γ は核磁気回転比、 δ はパルス幅である。膜に結合した 5FU の拡散係数は 303 K において $0.1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ であり、free のときの値 $9.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ に比べて 2 桁近く小さくなった。さらに、膜に結合した 5FU の拡散係数は、PFG ^1H NMR 測定によって得られた膜脂質分子の拡散係数 ($0.1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$) と同程度であった。このことから、膜中の 5FU が、膜分子の流動性に支配されつつ膜内を拡散している様子が明らかとなった (Fig. 4)。一方、高温では、5FU の運動状態は膜分子の運動に支配されず、脂質分子より大きな拡散係数を示した⁴⁾。

次に、FBPA について検討を行った。Fig. 5 に FBPA の 1D ^{19}F NMR スペクトルを示す。FBPA は疎水性が強く、水への溶解度が極端に低い。このため、NMR に

Fig. 4 Temperature dependence of the diffusion coefficients of membrane-bound and free 5FU, together with the mobility of the membrane lipid⁴⁾. Note that the dependence of the bound 5FU diffusion is deviated from the Arrhenius type at 313 K. For free 5FU and the lipid, the temperature dependences of the diffusion are of the Arrhenius type with activation energies of 21 (free 5FU) and 26 kJ/mol (lipid), respectively.

Fig. 5 1D ^{19}F NMR spectra of FBPA in the absence (a) and presence of 1 (b) and 40 mM EPC LUV (c) at 303 K. The solid lines show the observed spectra and the dashed lines are the fitting results of Eq. (4) to the respective NMR signals.

よるダイナミクスの定量解析は著しく困難であると考えられる。ここでは、溶媒である重水をFBPAに加えた後2日間激しく攪拌して、FBPAの水溶液を調製した。NMRでその濃度を定量したところ、63 μM であった。これに、脂質濃度0から40 mMまでのベシクルをそれぞれ加えた。FBPAはベンゼン環を2個含む構造であり、フッ素置換する前のビスフェノールAはオクタノール/水分分配係数の対数 $\log P_{\text{ow}}$ が3.32と大きな値を示すことから、膜への親和性が高い分子であると考えられる。したがって、脂質濃度が高ければ、FBPAのほとんどすべてが膜中に分布すると考えてよい。実際、Fig. 6に示すように、FBPAの1D ^{19}F NMRシグナルは、脂質濃度の増加に伴ってピーク位置が-64.22 ppmから-63.90 ppmと低磁場側にシフトし、濃度が15 mMを超えるとピーク位置やシグナルの形状がほとんど変化しないことを確認した。

そこで、脂質濃度0, 40 mMのベシクル存在下でPFG NMR測定を行い、freeのFBPA、膜に結合したFBPAの拡散係数を決定した。その結果、freeのFBPA、膜に結合したFBPAの拡散係数は、それぞれ $5.2 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ および $0.075 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ であった。膜に結合したFBPAの拡散係数は、5FUの場合と同様、freeの場合に比べて2桁程度小さくなっていることがわかった。

溶液やミセル中と比較して二分子膜のなかの薬物の拡散をNMRで観測することは極めてむずかしく、これまでモデル膜中での薬物の拡散挙動に関する研究は数例^{3,6,7)}

Fig. 6 Change in the chemical shift of FBPA ^{19}F NMR signal as a function of the EPC concentration c_{EPC} .

あるにすぎない。このようななかで、筆者らの開発した方法を有効に活用して、今後、プローブや標識を用いることなく、低分子からペプチド・タンパク質に至る膜のなかの薬物の拡散の“生の姿”がNMRで明らかにされることと思う。

5 親水的な薬物と膜との結合・解離のキネティクス

膜に対する薬物の結合と解離 (Fig. 7) は、拡散とともに、膜輸送を支配する重要なプロセスである。ところが、バルクと膜との間での薬物の結合・解離に関する研究は、現在までほとんど行われていない。そこで、筆者らは、上記2種の薬物の膜への結合、解離についてNMRによる研究を行い、結合・解離速度を *in situ* で定量化することに成功した⁸⁾。

薬物の運動状態を *in situ* で解析するために2つのNMR測定手段があることは、すでに述べた。このうち、親水性の5FUに対しては、高分解能溶液NMR測定とPFG法を組み合わせた解析が有効である。なぜなら、4で述べたように、膜に結合した (bound) 成分とfreeの成分は磁場勾配下で区別できるからである。そこで、ここでは、薬物の膜への結合・解離速度を明らかにするために、boundとfreeの状態間の交換を考慮したBloch方程式の解析解⁹⁾による解析を行った⁸⁾。Boundおよびfreeの状態のシグナル強度 I_B および I_F はそれぞれ

$$I_B(m) = \left\{ \frac{I_{B0}}{2} - \frac{\lambda I_{B0} - k_{FB} I_{F0}}{2\Delta} \right\} \exp \{ (-\sigma + \Delta) \tau \} + \left\{ \frac{I_{B0}}{2} + \frac{\lambda I_{B0} - k_{FB} I_{F0}}{2\Delta} \right\} \exp \{ (-\sigma - \Delta) \tau \} \quad (2)$$

Fig. 7 Motion of drugs at the lipid membrane interface: diffusion and the exchange between the free and the bound states. Here D_F and D_B are the diffusion coefficients of drugs in bulk water and the membrane. k_{FB} and k_{BF} are the rate constants of binding and dissociation, respectively.

$$I_F(m) = \left\{ \frac{I_{F0}}{2} + \frac{\lambda I_{F0} - k_{BF} I_{B0}}{2\Delta} \right\} \exp \{(-\sigma + \Delta)\tau\} + \left\{ \frac{I_{F0}}{2} - \frac{\lambda I_{F0} - k_{BF} I_{B0}}{2\Delta} \right\} \exp \{(-\sigma - \Delta)\tau\} \quad (3)$$

である。ここで、 k_{FB} 、 k_{BF} は結合・解離の速度定数、 $\sigma = (k_{BF} + k_{FB} + D_B m^2 + D_F m^2)/2$ 、 $\lambda = (k_{BF} - k_{FB} + D_B m^2 - D_F m^2)/2$ 、 $\tau = \Delta_{diff} - \delta/3$ および $\Delta = \sqrt{\lambda^2 + k_{BF} k_{FB}}$ である。また D_B および D_F はそれぞれ bound および free の 5FU の拡散係数である。最初に、式 (2) および (3) による解析の妥当性を確かめるために、bound および free の実測のシグナル強度に両式をフィッティングさせた。 k_{FB} と k_{BF} をフィッティング・パラメータとし、 D_B と D_F は式 (1) を用いて得られた値に固定した。結果は、Fig. 8 に示すように、両式は、いずれの温度においても実測値をよく再現した。

そこで、式 (2)、(3) を用いて結合・解離の速度定数 k_{FB} と k_{BF} を算出した。5FU の k_{FB} 、 k_{BF} は、濃度 10 mM では、脂質濃度 40 mM の膜に対して、303 K でそれぞれ 0.2 および 4.1 s^{-1} となった。したがって半減期はそれぞれ 3.5 および 0.17 s であり、5FU の膜への結合と解離は、NMR 測定の時定数 (サブ秒～秒) と同程度の slow exchange であることがわかった。また、 k_{FB} と k_{BF} の温度依存性から求めた活性化エネルギーは、57 kJ/mol であった。膜内での拡散運動については、Fig. 4 における D_B のアレニウスプロットから、活性化

Fig. 8 Signal attenuation of (a) free and (b) bound components of 5FU at 293 (□), 298 (◇), 303 (○), and 313 K (▽)⁸⁾. The symbols represent the experimental values and the solid lines are obtained by fitting Eqs. (2) and (3) to the signal intensity. The results of $T = 298, 303$, and 313 K are shifted to negative value by $-0.5, -1.0$, and -1.5 , respectively. The symbols in (a) indicate the average of the doublet peak intensities, and the error bar represents the deviation of the observed intensity from the average value.

エネルギーが 26 kJ/mol となることがわかっている⁴⁾。これらの比較から、5FU の膜法線方向の運動は、側方拡散に比べて制限されていることが明らかとなった⁸⁾。

6 疎水的な薬物と膜との結合・解離のキネティクス

FBPA の 1D NMR スペクトル (Fig. 5) では、いずれの脂質濃度においても bound と free のシグナルが分離されず、一本になっている。このことから、FBPA は 5FU の場合と異なり、高速で結合・解離を繰り返す fast exchange の状態にあることがわかる。シグナルは結合および解離状態が平均化されているため、5FU の場合のような PFG NMR 法による識別ができない。そこで、ここでは一次元の高分解能溶液 NMR シグナルを用いて、以下の解析を試みた¹⁰⁾。速度定数 k_{FB} 、 k_{BF} で bound と free の 2 状態間を交換する FBPA に対する Bloch 方程式から導かれる 1D NMR シグナル強度 $I(\omega)$ は

$$I(\omega) = I_B(\omega) + I_F(\omega) = \frac{I_0}{\pi} \frac{\beta_F f_B + k_{FB} f_F + \beta_B f_F + k_{BF} f_B}{\beta_B \beta_F - k_{BF} k_{FB}} \quad (4)$$

で表される。ここで ω は化学シフトに対応する振動数であり、 I_B と I_F は膜に結合した成分と free 成分のシグナル強度、 I_{B0} と I_{F0} はそれぞれの純状態を表し $I_0 = I_{B0} + I_{F0}$ である。 f_j は状態 j ($=B$ or F) の分子の割合である。また式 (4) 中の β_B および β_F は、

$$\beta_B = \frac{1}{T_{2B}^0} + \frac{i\omega_B^0}{2\pi} + k_{BF} - \frac{i\omega}{2\pi} \quad \text{および}$$

$$\beta_F = \frac{1}{T_{2F}^0} + \frac{i\omega_F^0}{2\pi} + k_{FB} - \frac{i\omega}{2\pi} \quad (5) \text{ 式}$$

ただし、 T_{2j}^0 と ω_j^0 は純状態 j ($=B$ or F) の横緩和時間と共鳴振動数である。

FBPA は脂溶性が高く水に溶けにくいいため、Fig. 6 から示唆される通り、高濃度ベシクル溶液中では、ほぼすべてがベシクルに結合している。そこで式 (5) の T_{2B}^0 と ω_B^0 は、高濃度ベシクル溶液 (EPC の濃度 $c_{EPC} = 40 \text{ mM}$) 中の FBPA のシグナルから、 T_{2F}^0 と ω_F^0 は FBPA 水溶液 ($c_{EPC} = 0 \text{ mM}$) 中の FBPA のシグナルから、それぞれ求めた。

実測した 1D スペクトルに式 (4) をフィッティングした結果を、Fig. 5 に破線で示す。いずれの場合も式 (4) は実測のスペクトルを良く再現することがわかる。したがって、式 (4)、(5) を用いて 1D スペクトルの解析を行った結果、温度が 303 K では FBPA の k_{FB} と k_{BF} が c_{EPC} に応じて数十～数百 s^{-1} の範囲で変化することがわかった。対応する半減期はいずれもミリ秒のオーダーとなる。これは 5FU の数十～数百分の一程度であり、FBPA が非常に高速で膜とバルクの間を行き来している様子がうかがえる。

このように、薬物の膜との結合解離の時定数が NMR 測定に要する時間より長いと同程度の場合 (slow exchange limit) には、PFG 法により結合および解離の 2 状態のシグナルを分離して解析し、また短い場合 (fast exchange limit) には、1D NMR 測定を行って 2 状態が混合したシグナルを解析すればよい。これらを使い分けることにより、さまざまな速さの結合解離運動の測定が可能であることが明らかとなった。

7 薬物の膜への結合量と膜内での熱力学的安定性

薬物の膜への結合量 f_B は、実測で得られた k_{FB} と k_{BF} から $f_B = k_{FB} / (k_{BF} + k_{FB})$ により評価することができる。そこで、膜に対する 5FU と FBPA の結合量を *in situ* で定量した。温度 303 K において、5FU は、濃度が 2～30 mM の範囲で全体の約 10% が膜に結合していた。一方、FBPA は、脂質の濃度 (0～40 mM) に応じて結合量が 0～100% の間で変化した。得られた結合量からバルクと膜中における自由エネルギー差 ΔG を評価すると、5FU の場合 ΔG は 3 kJ/mol であり、303 K における熱ゆらぎ 2.5 kJ/mol と同程度であった⁴⁾。このことから、5FU は膜への結合がそれほど優位でないことがわかる。この結果は、筆者らが現在行っている分子動力学シミュレーションによる計算結果とも一致する。一方、FBPA の ΔG は約 20 kJ/mol であり、膜との親和性が高いことが明らかとなった¹⁰⁾。5FU は核酸塩基であるウ

ラルシの誘導体であり親水的であるのに対し、FBPA は分子内にベンゼン環を 2 つ有する疎水的な分子である。薬物のこのような性質の違いに伴い、結合・解離の時定数や膜への親和性が大きく変化するものと考えられる。

8 薬物の膜への結合の効率

6 で示したように、FBPA の k_{FB} と k_{BF} は、脂質の濃度に依存して変化した。そこで、脂質濃度を一定としたときの結合・解離定数がどのように変化するかを検討した。平衡状態では速度定数は $k_{FB}f_F = k_{BF}f_B$ を満足する。したがって、脂質の濃度 c_{EPC} に対して

$$\frac{k_{FB}f_F}{c_{EPC}} = \frac{k_{FB}(1-f_B)}{c_{EPC}} = \frac{k_{BF}f_B}{c_{EPC}} = \text{const.} \quad (6)$$

ようになる。 $\frac{k_{FB}(1-f_B)}{c_{EPC}}$ は、Fig. 9 に示すように、いずれの c_{EPC} においても $(4 \pm 2) \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ の範囲内にあり、概ね c_{EPC} に依存しないことがわかる。これより FBPA の膜への結合を解離の速度の脂質 1 分子あたりの値は、 c_{EPC} が 0～3 mM の範囲でほぼ一定となる¹⁰⁾。

薬物は膜の表面に到達しても、すべてが膜内に取り込まれるとは限らない。膜表面にアクセスした薬物がどの程度効率的に膜のなかに取り込まれるかを明らかにすることができれば、ドラッグデザインなどの際に有効であると考えられる。そこで、筆者らは、5FU と FBPA について、バルクから膜に取り込まれる際の効率を以下のような方法で定量化した。まず最初に、バルクから膜表面に到達するのに要する時間 t_R と膜に結合するのに要

Fig. 9 Lipid concentration dependences of (a) the rate constants of FBPA binding k_{FB} (triangles) and dissociation k_{BF} (circles), the bound fraction f_B (diamonds, right axis), and (b) the values of $\frac{k_{FB}(1-f_B)}{c_{EPC}}$ in eq. (6).

Fig. 10 Model for evaluating the efficiency of FBPA binding. Here FBPA in the spherical system of radius r_s binds to the vesicle of radius r_v . t_R is the mean time interval for FBPA to reach at first to the membrane surface and t_B is the interval for FBPA to bind to the membrane.

する時間 t_B との比から、新たに動的な結合確率 $P = t_R/t_B$ を定義した。 t_R は以下の式 (7) で示される拡散律速反応の反応時間に対する理論式を用いて求めることができる。いま、Fig. 10 のように、系全体の半径が r_s 、ベシクルの半径が r_v の球で表され、それらの中心が同一の点となるような場合を考える。このとき、薬物がバルクからベシクル表面に到達するのに要する時間 t_R は、

$$t_R = \frac{r_s^2}{D} \frac{(1-x^2)(5+6x+3x^2+x^3)}{15x(1+x^2)} \quad (7)$$

で表される¹⁰⁾。ここで $x = r_v/r_s$ であり、 D はベシクルの中心から見た時の薬物の相対的な拡散係数である。4 でみたように、膜に結合した薬物やベシクル自体の拡散係数は、free の薬物に比べて約 2 桁程度小さいことから、ここでは D として free の薬物の拡散係数 D_F を用いた。

Table 1 に 5FU および FBPA の膜に対する結合確率 P の値を示す。FBPA の場合、 P は c_{EPC} に依らず 0.04 ± 0.01 となる。一方、5FU について計算すると、 4.1×10^{-7} 程度であった。FBPA に比べて 5FU の値は 1/100,000 程度の小さな値となっており、著しく膜の取り込み効率が低下していることがわかる。FBPA に比べて 5FU が親水的であることが強く影響していることによるものと考

えられる。

9 おわりに

筆者らは、膜の構造的なゆらぎや膜輸送などに関連した分子の動きを理解するために、膜のなかの分子の運動を NMR で直接観測する 2 種類の NMR 測定方法を開発した。一つは、高分解能 NMR とパルス磁場勾配スピネコー法を組み合わせたもの、もう一つは、脂質濃度を変化させて高分解能の 1D NMR 測定を行うというものである。これらを親水のおよび疎水的な 2 種の薬物について適切に使い分けることで、薬物の膜への結合、膜中の拡散、および膜との結合・解離のキネティクスを *in situ* で定量化することができた。系に摂動を与えることなくそのままの状態を捉えることが可能な NMR 測定は、揺らぎをともなう膜へのドラッグデリバリー研究に対して有力な手法である。今後、膜のなかの生理活性ペプチドや膜タンパク質の動態の解析、あるいは、生きた細胞へのドラッグデリバリー研究など興味深い系への適用が期待される。

本稿で紹介した筆者らの研究は、科学研究費補助金・基盤研究 (No. 20550027) および新学術領域研究「揺らぎが機能を定める生命分子の科学」(No. 21107527) からの助成によって実施された。また、一部、資生堂女性研究者サイエンスグラントからも助成をいただいた。ここに深謝申し上げたい。

文献

- 1) E. Okamura & M. Nakahara, *Liquid Interfaces in Chemical, Biological, and Pharmaceutical Applications* (A. G. Volkov edn), Marcel Dekker, New York, pp.775-805 (2001).
- 2) P. Stilbs, *Prog. NMR Spectrosc.*, **19**, 1-45 (1987).
- 3) E. Okamura, C. Wakai, N. Matubayasi, Y. Sugiura & M. Nakahara, *Phys. Rev. Lett.*, **93**, 248101-1 ~ 4 (2004).
- 4) E. Okamura & N. Yoshii, *J. Chem. Phys.*, **129**, 215102-1 ~ 8 (2008).
- 5) E. O. Stejskal & J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.*, **42**, 288-92 (1965).
- 6) H. C. Gaede & K. Gawrisch, *Biophys. J.*, **85**, 1734-40

Table 1 Mean time intervals t_R and t_B , and the dynamic binding probability P of FBPA molecules. The values for 5FU calculated from the previous data⁸⁾ are also listed in the right column. All values are at 303 K.

	FBPA				5FU ^a
c_{EPC} (mM)	0.4	1.0	2.0	2.5	40
t_R (ms)	0.92	0.34	0.15	0.12	1.8×10^{-3}
t_B (ms)	27	6.5	7.2	3.6	5.0×10^{-3}
P	3.4×10^{-2}	5.2×10^{-2}	2.1×10^{-2}	3.3×10^{-2}	4.1×10^{-7}

^a 5FU at 10 mM.

(2003).

- 7) H. C. Gaede, W. M. Yau & K. Gawrisch, *J. Phys. Chem.*, **B109**, 13014-23 (2005).
8) N. Yoshii & E. Okamura, *Chem. Phys. Lett.*, **474**,

357-61 (2009).

- 9) C. S. Johnson Jr., *J. Magn. Reson.*, **A102**, 214-8 (1993).
10) N. Yoshii & E. Okamura, submitted.