

バイオサーファクタントとリポソーム

Biosurfactants and Liposome

大平純子、小川昭二郎

Junko Ohira, Shojiro Ogawa

(お茶の水女子大学大学院 人間文化研究科 ライフサイエンス専攻)

1. はじめに

バイオサーファクタントとは微生物が生産する界面活性剤であり、化学合成のものに比べて多機能かつ生分解性に優れているため、様々な産業への利用が期待されている。一方、リポソームとは、生体膜の主要構成成分であるリン脂質によって形成される二分子膜の閉鎖小胞体であり、生体膜モデルとして広く利用されている。また、その内水相には水溶性物質を、二分子膜内部には油溶性物質を保持できることから、遺伝子や薬物搬送システム (DDS) のキャリアとしての応用も期待されている。

近年、産総研の北本主任研究員らにより糖脂質型のバイオサーファクタント (マンノシルエリスリトールリピッド、MEL) を含有する遺伝子導入用リポソームは、従来のものに比べて遺伝子導入効率が 70 倍以上の効率を示すという興味深い結果が報告されている<sup>1)</sup>。

そこで、本稿ではバイオサーファクタントとリポソームの概要、さらに MEL を含有したリポソームを調製しその構造と物性に関する実験結果についてまとめた。

2. バイオサーファクタント

バイオサーファクタントとは生体由来の界面活性剤である。微生物と天然油脂や炭化水素などの再生可能資源を原料とするので環境への負荷が小さいことが特徴である。基本構造は分子内に糖やアミノ酸や脂肪酸等の親水性部分と炭化水素等の疎水性部分をもっている。その親水基の特徴から、糖脂質型、脂肪酸型、アシルペプチド型、高分子型に分類され、現在では数十種類のものが知られている。バイオサーファクタントの多くは、合成界面活性剤に比べて、

- ① 複数の官能基や光学活性点
  - ② 複雑でかさ高い (bulky な) 構造
  - ③ 生分解を受けやすい構造
- などを有している。一方、その機能的な特徴として、
- ① 低濃度で大きな界面活性
  - ② 優れた分子集合体・液晶形成能
  - ③ 生理活性作用

などを発揮することが挙げられる<sup>2)</sup>。

図1に主なバイオサーファクタントの例を示す。

2.1 マンノシルエリスリトールリピッド (MEL)

MEL とは酵母菌 (*Candida Antarctica* T-34 株) によって、油脂や炭化水素から大量生産可能な糖脂質型のバイオサーファクタントである<sup>3)</sup>。MEL は優れた界面活性を示すばかりではなく、それ自身が分子認識機能や抗腫瘍活性等の生理活性を示し、さらに巨大ベシクル形成能を有することが判っている。さらに、遺伝子治療の研究に応用したところ、従来の方法に比べがん細胞に遺伝子を導入したときの遺伝子導入効率が 50~70 倍に向上することが見出された<sup>1)</sup>。他にも MEL は生分解性をもつなど環境保全技術やバイオナノテク技術や先端医療技術など様々な分野への応用が考えられている。MEL の構造を図2に示す。

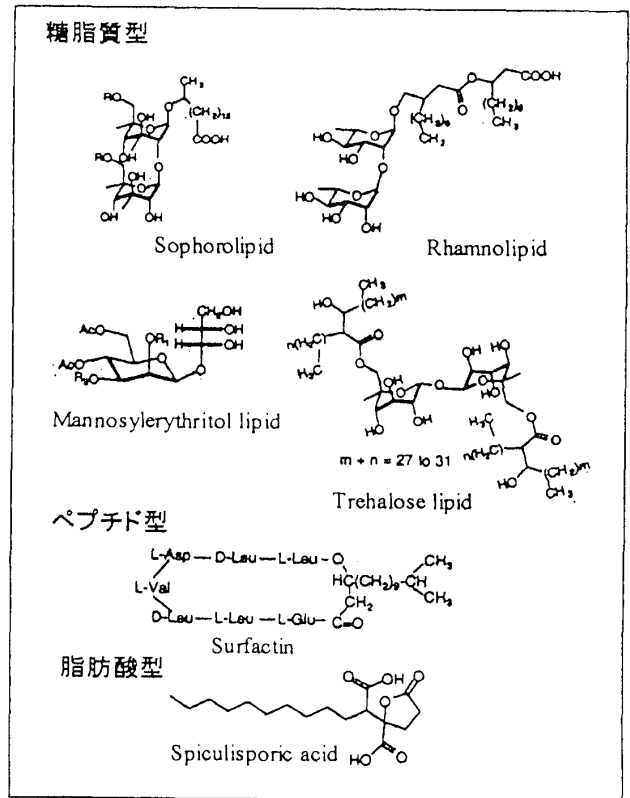


図1. バイオサーファクタントの例

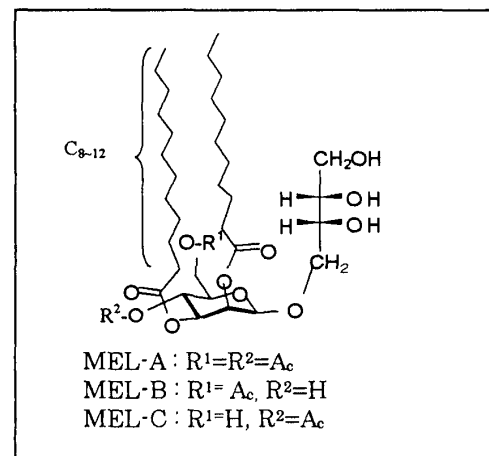


図2. マンノシルエリスリトールリピッドの構造

3. 生体膜

生体膜は細胞の中に見出される膜状の構造である。生命の単位が細胞であるため、生命のあるところには必ず生体膜がある。生体膜は外界と生命の場の境界となって、生命の維持に必要な諸物質をその中に保持し、また外界からの有害物質の侵入を防ぐ。その反面、細胞の代謝に必要な物質を特異的に受け入れ、不要な代謝産物を外界に送り出す役割もある。つまり、障壁と輸送という二つの矛盾した機能を上手に使い分けているのである。生体膜はさらに、多くの物質の変換、情報の受容、伝達、エ

エネルギーの変換を効率的に行う場として、生命現象には不可欠なのである<sup>4)</sup>。

生体膜は、脂質とタンパク質を主成分とし、図3に示す脂質二分子膜を基本とする Singer-Nicolson の流動モザイク説が一般に知られている。脂質が形成する二分子膜は生体膜の障壁としての役割の分担が主で、生体らしい特異的で能動的な機能は膜タンパク質が担う。生体膜を構成している脂質の種類には様々なものがあり、脂質の二分子膜中でのその分布は場合によって2次元方向においても3次元方向においても極めて不均一である<sup>5)</sup>。さらに、1994年に箱守らが提唱した生体膜モデル(図4)では、糖脂質(glycosphingolipid-enriched microdomain; GEM)を形成し、それにより情報伝達機能が調節・制御されているという新しい概念が打ち出された<sup>6)</sup>。特に、糖脂質はその脂質部分を細胞膜の外層に埋め込んで、糖鎖を細胞外に突き出していると考えられている。

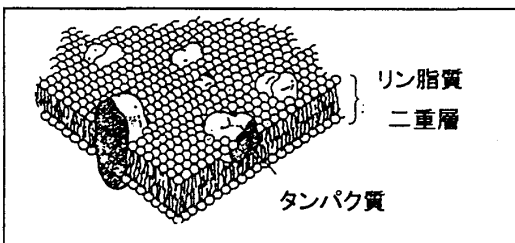


図3 Singer-Nicolson の流動モザイクモデル

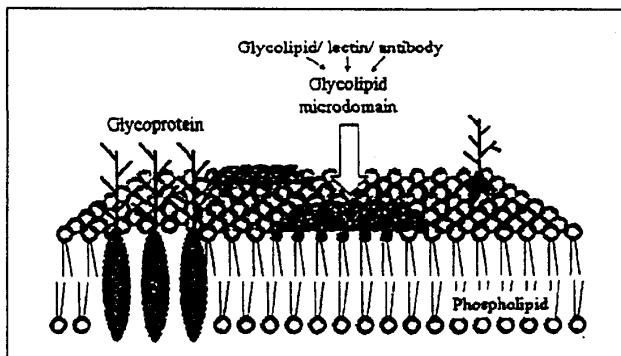


図4 糖脂質モデル

以後もこの分野に関する研究は盛んに行われ、現在の最も新しい説では、糖脂質がコレステロールとともに筏(raft)<sup>7)</sup>と呼ばれるドメインやカベオラ(caveolae)<sup>8)</sup>と呼ばれる細胞膜表面の小さなくぼみ構造を形成しているモデルが提唱されている。筏やカベオラは、細胞接着や受容体を介したシグナル伝達の発現に機能していると考えられている。また、糖脂質のリッチドメインは、病原体(コレラ菌, O157, HIV)やその他の毒素の結合に際し、ターゲットとして機能している。このように、生体膜中の糖脂質が果たす機能の解明には、現在も多くの研究者の注目が集まっている。

4. リポソーム

リポソームとは、生体膜由来のリン脂質により構成される二分子膜の閉鎖小胞体である。リポソームは、そのサイズや脂質二重層の数から分類すると、小さな一枚膜リポソーム(SUV)、多重膜リポソーム(MLV)、および大きな一枚膜リポソーム(LUV)に分類される。

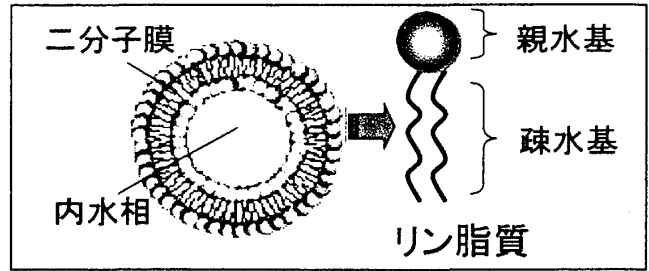


図5 リポソーム

生体膜由来の脂質は必ずしもすべてがそれ単独でリポソームを形成するわけではない。脂質はその形態からシリンダー型、コーン型、逆コーン型の3種に分類される(図6)。親水性と疎水性のバランスがよくとれている分子はシリンダー型分子と呼ばれ、ラメラ構造をとる。これに対し、親水性が相対的に強い分子は逆コーン型(くさび型)分子と呼ばれ、ミセルを形成しやすく、親水性基が小さい分子はコーン型分子と呼ばれ、ヘキサゴナルII構造を形成しやすい<sup>5)</sup>。

	分子形	会合形	代表脂質名
シリンダー型	極性基 非極性基	二分子膜 (ラメラ相) 二重層膜	ホスファチジルコリン スフィンゴミエリン 飽和型ホスファチジルコリン エタノールアミン
コーン型		ヘキサ ゴナルII	不飽和型ホスファチジル エタノールアミン(TcH以上)
逆コーン型		球状 ミセル モノマー	リゾホスファチジルコリン 遊離脂肪酸塩

図6 脂質の形状とその会合体の構造

5. MELを含有したリポソームの構造と物性

これまで述べてきたように、MEL-Aを含有する遺伝子導入用リポソームは、従来のものに比べて飛躍的に遺伝子導入効率を示すことが判っている<sup>1)</sup>。しかし、MEL-Aを含有したリポソームの物理化学的性質や分散安定性は、未だ十分に明らかにされていない。そこで、各種のリン脂質をマトリックスとしMEL-A含有リポソームの調製を試み、その物理化学的性質や分散安定性について検討した。

今回使用したバイオサーファクタントは、4-O-[(4',6'-di-O-acetyl-2',3'-di-O-alkanoyl)-β-D-mannopyranosyl]D-erythritol(MEL-A)である。また、リン脂質には鎖長(n)の異なる飽和炭化水素鎖を有する L-α-phosphatidylcholine (n=12: DLPC, n=14: DMPC, n=16: DPPC, n=18: DSPC)を用いた。

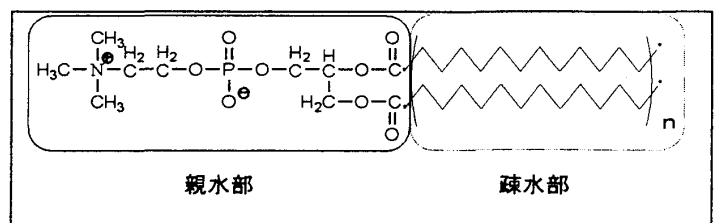


図7 リン脂質

なお、リポソームの調製は Bangham 法にて行い、その形態は光学顕微鏡及び共焦点レーザー走査顕微鏡(CLSM)により観察した。

5.1 保持容積測定

はじめに、MEL-A と種々のリン脂質の混合リポソームの調製を試みた。その結果、いずれのリン脂質を用いた場合でも、光学顕微鏡観察からドーナツ状の分子集合体が確認され、混合リポソームが形成することが分かった。さらに、リポソームの保持容積(単位脂質あたりの内水相容積)に及ぼすリン脂質鎖長の影響をカルセイン外部消光法により検討したところ、いずれのリン脂質を用いた場合も、MEL-A の添加はリポソームの保持容積を増大した。特に鎖長の短い DLPC を用いた場合、その増大効果が顕著であり、最も効率的にリポソームを形成することが分かった。そこで、DLPC/MEL-A 混合リポソームの物性を詳細に検討した。DLPC リポソームの保持容積に及ぼす MEL-A 添加の影響を図 8 に示す。

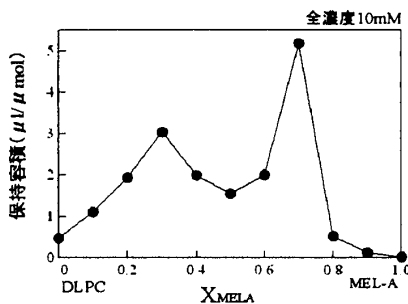


図 8 DLPC/MEL 混合リポソームの保持容積

MEL-A の添加は、リポソームの保持容積を飛躍的に向上し (10 倍以上)、特に X<sub>MEL-A</sub>=0.3、0.7 において極大となることが分かった。

5.2 顕微鏡観察

一方、X<sub>MEL-A</sub>=0.8 以上の場合、CLSM では脂質粒子が多数観察され、リポソームは形成しないことが分かった。一般にリポソームの保持容積は、その自発曲率 (粒子径) に依存し、自発曲率が大きくなる (粒子径が小さくなる) と一枚膜リポソームの形成が促進し、保持容積が大きくなることが知られている<sup>9) 10)</sup>。

5.3 粒子系測定

そこで、リポソームの粒子径に及ぼす MEL-A 添加の影響を動的光散乱法により検討した。リポソームの平均粒子径と保持容積との関係を図 9 に示す。

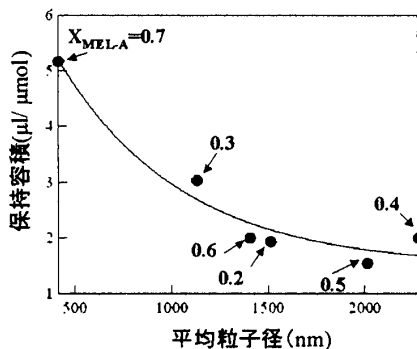


図 9 保持容積と平均粒子径の関係

平均粒子径と保持容積は良く相関し、特に保持容積が極大であった X<sub>MEL-A</sub>=0.3、0.7 において、粒子径が小さく (自発曲率大) なることが分かった。このことから、X<sub>MEL-A</sub>=0.3、0.7 の組成では、小さな一枚膜リポソームが形成していることが示唆された。

5.4 分散安定性評価

さらに、リポソームの実用上必要な分散安定性を目視観察及び吸光度の経時変化測定により検討した。その結果、リポソームの分散安定性も X<sub>MEL-A</sub>=0.3、0.7 において良好であり、特に X<sub>MEL-A</sub>=0.7 の組成では、リポソームは 1 ヶ月以上も分散安定であった。

5.5 MEL-A のリオトロピック液晶観察

これまでの結果から、リポソームに MEL-A を混合すると、その形態が劇的に変化することが明らかになった。この形態変化は、MEL-A の幾何学的構造に起因するものと考えられる。そこで、MEL-A の幾何学的構造を推定するため、MEL-A の高濃度領域における液晶観察を行った。その結果を図 10 に示す。これは MEL-A の高濃度の薄膜を張って左から水和させていったものである。これより、MEL-A はある濃度以上ではヘキサゴナル II 構造をとることがわかった。このヘキサゴナル II は、負の自発曲率をもつ分子 (コーン型分子) が形成しやすいことが知られており、このことから MEL-A はコーン型の分子であることが判った。

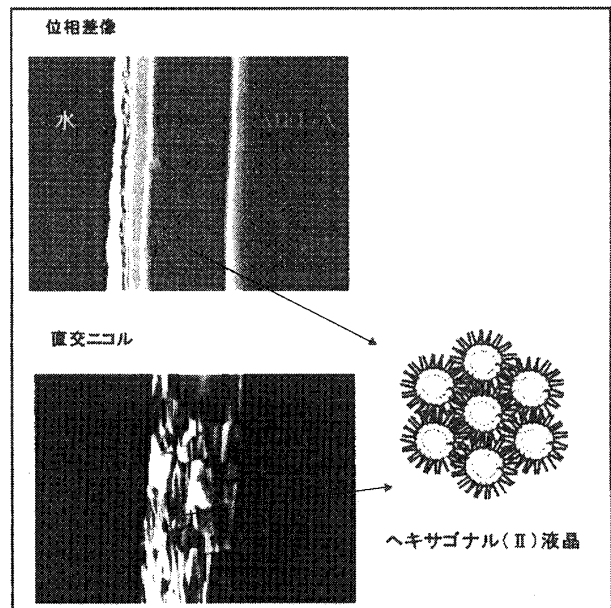


図 10 MEL-A のリオトロピック液晶観察結果

6. 考察

これまでの実験結果を以下のように考察した。MEL-A の添加はリポソームの形態や分散安定性を劇的に変化させることが判ったが、このことは脂質の幾何学的性質に起因していると考えられる。

本実験では、DLPC リポソームに MEL-A を当量混合した場合、曲率が単独の場合に較べると大きいが周りの組成 (X<sub>MEL-A</sub>=0.3 や 0.7) より小さくなり、保持能や分散安定性は低下することが判った。また、DLPC リポソームに MEL-A を少量混合した場合、自発曲率が増大した。このことは MEL-A-rich 側も同様である。

一般にリポソームの構造はその自発曲率に依存する<sup>10)</sup>。まず、DLPC 分子は親水性と疎水性のバランスがつかっているシリンダー型をしており自発曲率の小さな多重膜リ

ポソームを形成することが知られている<sup>9)</sup>。一方 MEL-A 分子は液晶観察結果から疎水性部分の強いコーン型に分類されることがわかった。通常コーン型分子とシリンダー型分子により構成される SUV ではコーン型分子は内側に分布しやすい。

また、Siewert らのコーン型とシリンダー型分子のコンピュータシミュレーションによると、コーン型分子が rich な組成では二分子膜の内側の膜にコーン型分子が多く外側の膜にシリンダー型分子が多く存在することがわかっている。さらに、この様な混合系ではリポソームの界面の水の量が減少する。このため親水基部分のスペースはより広くなり、内側ではシリンダー型分子の減少により親水基部分がより密にパッキングすることがわかっている。このような効果により内側の膜は外側の膜の二倍密になるという結果が得られている<sup>11)</sup>。

本実験では、DLPC リポソームに MEL-A を少量混合すると MEL-A 分子は内側へ分布し曲率が生じたため膜枚数の少ないリポソームが形成したものと考えられ、このことは MEL-A rich 側も同様であり、また DLPC と MEL-A を当量混合した場合、再び自発曲率が減少するものと考えられる。このため  $X_{MEL-A}=0.3, 0.7$  のときに保持容積が大きくなると考えられる。また、コーン型のホスファチジルコリンエタノールアミンはシリンダー型のホスファチジルコリンに比べ隣接脂質とより固いネットワークを形成しているといわれている。さらに、内側の膜は外側の膜の二倍密になることにより、MEL-A rich 側の組成である  $X_{MEL-A}=0.7$  のときに最も内側の膜の MEL-A 分子のパッキングが強くなり保持容積が最大となると考えられる。このように、実験結果は Siewert らの結果とよく一致した。

ソームを調製し、その物理化学的性質や分散安定性について評価した。その結果以下のようなことが明らかになった。

- ①各種リン脂質をマトリックスとした MEL-A を含有するリポソームが形成した。特に鎖長が MEL-A と類似した DLPC を用いると最も分子間相互作用が強く働き保持容積が飛躍的に増大した。
- ②リポソームの形態は MEL-A の組成に依存して劇的に変化し、特に組成が  $X_{MEL-A}=0.3$  と  $0.7$  付近で最もリポソームの粒子径が小さい。
- ③また、分散安定性も組成が  $X_{MEL-A}=0.3$  と  $0.7$  付近において最も良好。
- ④これらの現象を脂質の幾何学的構造に起因する二分子膜の不均一分布で説明しモデルを提唱した。このモデルはいずれの実験結果とも良く一致した。

8. おわりに

生体内では、脂質は多種存在し流動性を保ちながら二分子膜の内外 (trans-bilayer) または平面方向 (lateral) に不均一に分布することにより膜を安定化していると考えられる<sup>5)</sup>。本研究で調製した MEL-A 含有リポソームは、脂質分子の幾何学的構造や不均一分布により、その組成に依存して劇的に形態が変化するのみならず、動物細胞と膜融合して遺伝子導入効率を飛躍的に向上するなどの多彩な機能を発現するものと考えられた。また、生体への負荷が小さな MEL-A を DLPC へ混合させると簡便にリポソームは分散安定化することが判った。このような分散安定性の良い膜融合型のリポソームは、今後遺伝子導入や薬物運搬体への実用的な利用が期待される。

参考文献

- 1) D. Kitamoto, S. Ghosh, Y. Nakatani, G. Ourisson, *Chem Commun.* **2000**, 861-862.
- 2) D. Kitamoto, S. Akiba, T. Hioki, T. Tabuchi, *Agric. Biol. Chem.* **1990**, 54, 31-36.
- 3) 北本 大, *オレオサイエンス* **2003**, 3, 663-672.
- 4) 香川端雄“イラストでみる生体膜と疾患の分子生物学”南山堂 (1993)
- 5) 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三“リポソーム”南江堂(1988)
- 6) 箱森仙一郎, “別冊日経サイエンス 111 糖鎖と細胞”入村達郎編, 日経サイエンス社, 20(1994)
- 7) R.G.Parton and K.Simons, *Science*, **269**, 1398, (1995)
- 8) K.Simons and E.Ikonen, *Nature*, **387**, 569 (1997)
- 9) 若山信行“生体膜の分子 —その姿、かたち、振舞い—”共立出版(1994)
- 10) H.T.Jung et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 1353-1357
- 11) Siewert J.Marrink and Alan E. Mark, *J.Am.Chem.Soc.* **2003**, 125, 15233-15242

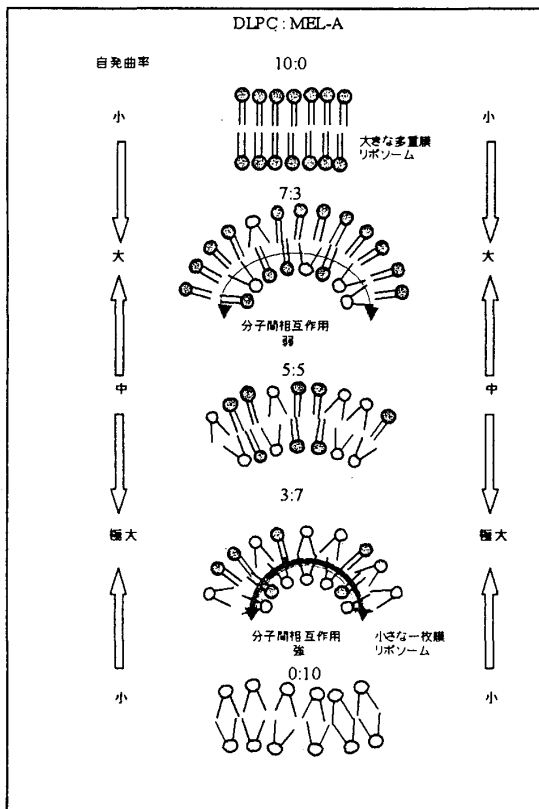


図 10 組成に依存したリポソームの形態変化メカニズム

7. まとめ

本研究では MEL-A を種々のリン脂質と混合した混合リポ