# リン脂質ベシクルの表面修飾と分子集合体としての 機能発現に関する研究

# <sub>筑波大学化学系</sub> 古澤邦夫

Mixed vesicles including phosphatidylcholine(PC), phosphatidyl serine(PS) and amphoteric crown ether compound ( $C_{1\#}$ -OCH<sub>2</sub>-18-crown-6) with different component fractions were prepared and their ion-complexing phenomena was examined by measuring their electrophoretic mobilities in different salt solutions. The crown ether compounds retained their selectively ion-complexing ability for some special cations(K<sup>+</sup> and Ba<sup>2+</sup>) even on the vesical surfaces. The zeta-potentials of the mixed vesicles of PC+ PS+crown were determined extensively by fraction of the PS component and variation in metal cations in aqueous solution. That is, this parameter shifted remarkably in a negative direction with increase in the PS-fraction only in salt solutions containing K<sup>+</sup> or Ba<sup>2+</sup>. No shifting of zeta-potentials could be detected in the case of (i) PC+PS vesicles without crown ether or, (ii) salt solutions that did not complex with the crown ether(Li<sup>+</sup> or Ca<sup>2+</sup>).

### 1. 緒 言

生体膜は多種類の脂質分子の二分子膜が流動的 に二次元に広がっているところに種々のタンパク 質などの機能性物質が組み込まれた構造をとって おりい、ここを通してイオンの選択透過や情報の 伝達など様々な機能がなされている。また、リン 脂質ベシクル(リポソーム)は、生体膜のモデルと してイオンの吸着性や透過性の研究に広く利用さ れている<sup>2)</sup>が、イオン透過の研究モデルとしては 不充分な点もある。それは生体膜にはイオンの濃 度勾配に基づく受動輸送以外に carrier や channelと呼ばれる特異なタンパク質等によって促進輸 送も行うという高度な機能を有するからである<sup>3</sup> 一方、コロイド化学的な側面から眺めるとベシ クルは個々のリン脂質分子の集合体から成る疎水 コロイドであるため、極性基の異なるリン脂質や 特異な機能をもつ両親媒性物質を混ぜ合わせた混

合ベシクルを調製し、それらの物性を研究するこ とから、機能性粒子としての機能発現のメカニズ ムを調べる対象として有用である。

我々は今までホスファチジルエタノールアミン (PE)およびホスファチジルセリン(PS)ベシクル の表面に各種金属陽イオンの結合性をコロイド化 学的手法で調べたところ<sup>2).4)</sup>, K<sup>+</sup> < Mg<sup>2+</sup> < Ca<sup>2+</sup> < La<sup>3+</sup> < Th<sup>4+</sup>の順序で強くなることを見 いだし,結合性の強さに応じてこれら各種陽イオ ンは2種類の異なった機構でベシクル粒子の凝集 を誘起することがわかった<sup>2)</sup>。その第一は荷電中 和の機構で,ベシクル表面の電荷が中和されて粒 子間の Vander Waals 引力で凝集する機構であ る<sup>5)</sup>。この凝集はベシクル表面への結合力の強い 多価陽イオン(La<sup>3+</sup>やTh<sup>4+</sup>)を添加すると起こる。 第二の機構は二価金属陽イオン(Ca<sup>2+</sup>やMg<sup>2+</sup>) が起こす粒子間結合,すなわち,2個の粒子間に またがったこれらイオンの橋かけ形成が原因で起

Surface Modification of Phospholipid Vesicles and Its Functionality as a Molecular Assembly

Kunio Furusawa

こる凝集である。第二の機構で凝集する場合は金属陽イオンの凝集限界濃度はベシクル濃度の増加 と共に減少する傾向が見られた<sup>21</sup>。

本研究では各種リン脂質の単独ベシクルに加え て、長鎖の炭化水素鎖をもつクラウンエーテル化 合物を機能性物質に選び, 各種リン脂質に混ぜ合 わせた混合ベシクルを調製した。酸素原子と炭素 原子が環状に配列したクラウンエーテル化合物は オキシエチレン基と同様に水素結合性の親水基で あると共に、 選択的に特殊な金属イオンと錯形成 する能力があることは広く知られた事実である。 また、その側鎖に疎水基を導入することにより非 イオン界面活性剤としても機能する。従って、ベ シクル構成成分としてこれを混入させると両親媒 性クラウンエーテルが備えているイオン選択的錯 形成、組織的分子会合性および界面吸着性等の基 本特性をベシクル粒子の形態で付与することがで きると期待される。ここでは種々な条件下で形成 されたクラウンエーテル混入ベシクルの機能性, 特に各種陽イオンとの相互作用について、それら の電気泳動実験より検討した。

#### 2.実験

#### 2.1 試料

リン脂質の基本試料としては卵黄から抽出した L- $\alpha$ -ホスファチジルコリン(PC)を使用した。 PCは正および負に荷電した基を1個ずつもつ中 性リン脂質の典型である。このPCに牛の脳から 抽出したL- $\alpha$ -ホスファチジルセリン(PS)およ び長鎖クラウンエーテルをいろいろな組成で加え た混合ベシクルを調製した。PSはリン酸基とア ミノ基に加えカルボキシル基を持つ酸性リン脂質 である。長鎖クラウンエーテルには炭素数18の直 鎖のアルキル基をもつoctadecyloxymethyl-18 -crown-6(C<sub>18</sub>-OCH<sub>2</sub>-18-crown-6, 混合ベ シクル系ではcrownと表記する)を使用した。こ の化合物は群馬大学工学部桑村研究室で合成され、 精製されたものをそのまま使用した。Fig.-1に



Fig. 1 Molecular structures of PC, PS and  $C_{18}$ -OCH  $_2$ -18-crown-6

これら化合物の構造式をそれぞれ示す。本実験で は4種類の金属塩化物(BaCl<sub>2</sub>, KCl, CaCl<sub>2</sub>, LiCl)を使用したが,いずれも市販(和光純薬 株)の特級品をそのまま使用した。これらの金属 陽イオンとC<sub>18</sub>-OCH<sub>2</sub>-18-crown-6との錯形 成安定度(K)は,水中,25℃においてlog Kで 3.87(Ba<sup>2+</sup>)>2.03(K<sup>+</sup>)>~0.5(Ca<sup>2+</sup>)>~0(Li<sup>+</sup>) の順である<sup>61</sup>。また水相として使用した水はすべ て2回蒸留し,Barnstead(USA)社のNANO Pureシステムで精製したものを用いた。

#### 2.2 ベシクルの調製

ベシクルの調製は主にExtrusion法(押し出し 法)で行った。この方法は"凍結-融解"を繰り 返してunilamellarityとtrapping効率を著しく 増大させることができ、またフィルターの孔径を 変えることによってベシクルの粒径を任意に制御 できる特徴をもつ。まず、通常の超音波法と同様 に試料を懸濁させてLarge Multilamellar Vesicles(LMV)を作り、次にこのLMVを液体 窒素中に入れて凍らせ、40~60°Cの温水中に入 れて解凍する"凍結-融解"の操作を5回繰り返 した。その後Lipex Biomembran 社製のExtruder 装置の中にポリカーボネート製フィル ター(Nuclepore 社製)を2枚重ねて敷き、その中 に試料溶液を注入した。次に窒素ガス20~30atm の圧力でベシクルをフィルターから押し出す操作 をまず0.2 $\mu$ m孔径のフィルターで5回繰り返し、

さらにフィルターを0.1 µm 孔径のものに変えて5 回繰り返しUnilamellar Vesicles(UV)を調製 した。

参照のため超音波分散法によってもベシクルを 調製し,従来と同様<sup>2).4)</sup>に遠心処理とゲル濾過 法で精製後使用した。

#### 2.3 ベシクルの粒子径分布および膜構造の観察

リン脂質に長鎖クラウンエーテルを種々な割合 で混合して調製したベシクルの粒径分布を動的光 散乱法で測定した。測定には大塚電子(㈱製の粒子 解析装置(LPA-3000)を使用した。また,いろ いろな組成から成る混合ベシクルの膜構造を電子 顕微鏡で観察した。各種ベシクルを酢酸ウラニル で染色し,日立製作所製透過型電子顕微鏡(H-800型)により加速電圧200kVで観察した。

#### 2.4 電気泳動測定

各種リン脂質の単独ベシクルおよびクラウンエー テル混入の混合ベシクル表面への各種金属陽イオ ンの吸着作用を調べるためにベシクル粒子の電気 泳動速度を測定した。まずベシクル懸濁液(Cp= ~0.005g/dL)2mLに各種濃度の塩溶液10mLを 密栓付き試験管に取り、20℃で一晩ゆるやかに転 倒かくはんした後電気泳動測定を行った。各試料 の電気泳動速度は顕微鏡電気泳動装置(Rank Brother M-2)により25℃で求め、Helmholtze -Smoluchowski式より $\zeta$ -電位を算出した。

#### 結果および考察

#### 3.1 混合ベシクルの形状と膜構造

Fig.-2はExtrusion法で調製した PC 単独ベ シクルおよび PC+crown(1:1)混合ベシクルの粒



Fig. 2 Distribution curves of particle sizes of PC and PC + crown(1:1)vesicles.

子径分布曲線を示す。これらの試料はいずれも最 後に孔径0.1 µmのポリカーボネートフィルター を用いて調製したものであるが、フィルターの孔 径に合致した平均粒子径をもつ単分散ベシクルが 調製されていることがわかる。また、いずれも粒 子の分散は著しく安定で、2~3日間放置しても粒 子径分布の変化はほとんど認められないことが確 認された。このような傾向は他の混合ベシクル、 例えば PC+PS+crown 混合ベシクルにおいても 同様に認められた。

Fig.-3は超音波分散法で調製した PC+crown (1:1)混合ベシクルの電子顕微鏡写真を示す。混 合ベシクルにおいても明確なラメラ構造が認めら れ、二分子膜の存在がはっきりと確認される。ラ メラ構造は C<sub>18</sub>-OCH<sub>2</sub>-18-crown-6の含有量を



Fig. 3 Electron micrograph of the PC + crown (1:1)vesicles stained by uranyl acetate.

2倍に増大させたベシクルの場合でも同様に観察 されることから本研究に使用したクラウンエーテ ル分子はリン脂質との相溶性がよく造膜性に優れ た特質をもつことがわかる。

# 3.2 PC単独ベシクルへの各種金属イオンの 吸着性

クラウンエーテルで修飾されたリン脂質ベシク ルへの金属イオンの吸着作用を調べる前に、まず PC単独ベシクルへの金属イオンの吸着性を各種 金属塩水溶液中で処理したベシクル粒子のと-電 位を測定して調べた。Fig.-4はそれらの結果を まとめたものである。 PC分子は電気的には中性 な物質であるが、本実験では金属を添加しない場 合 PC ベシクルは-40~-50mV の負電位を示し た。この原因については今のところ明確な説明を 与えることはできないが、ここでは塩添加によっ てベシクルのと-電位がどれだけ正側へシフトし たかで各種カチオンとの相互作用の強さを調べる ことにした。Fig.-4より金属イオン濃度が10<sup>-4</sup> mol・dm<sup>-3</sup>になると金属イオンの一価と二価に よる電位の差が生じる。もちろん負に帯電した膜 表面への Screening 効果は一価イオンと二価イ オンでは異なるが<sup>5)</sup>,とくにCa<sup>2+</sup>イオン添加の



Fig. 4 ζ -Potential of PC vesicles in various salt solutions.

系で観察される濃度10<sup>-3</sup>mol・dm<sup>-3</sup>近辺からの ζ-電位の正側への大きなシフトはCa<sup>2+</sup>イオン のリン脂質ベシクルへの高い吸着性に基づくもの と思われる<sup>7)</sup>。

# 3.3 PC+crown 混合ベシクルと金属イオンの 相互作用

Fig.-5は PC に C<sub>18</sub>-OCH<sub>2</sub>-18-crown-6を 重量比で1:0.5の割合で混合して得たベシクルを 試料に用いた際の結果で、各種金属イオンの濃度 となー電位の関係がプロットされている。まず、 クラウンエーテルとの錯形成安定度が小さいLi<sup>+</sup> イオンやCa<sup>2+</sup>イオンを添加した場合はPC単独 ベシクルの場合(Fig.-4)とほぼ同じ曲線が得ら れ、クラウンエーテルを混入した効果は認められ ない。一方、錯形成安定度の大きいK\*イオンや Ba<sup>2+</sup>イオンの添加系では金属イオンの濃度の増



❶;Ca²⁺, O;Ba²⁺, ⚠;Li⁺, △;K⁺

Fig. 5 ¢ -Potential of PC+crown(1:0.5)vesicles in various salt solutions.

加と共にζ-電位は正側へ大きくシフトしている。 特にBa<sup>2+</sup>イオン添加の場合その傾向は顕著で、 既に10<sup>-5</sup>mol・dm<sup>-3</sup>でベシクルは正のζ-電位 を示すことがわかる。これはBa<sup>2+</sup>イオンのクラ ウンエーテルへの錯形成安定度が高いことに加え て二価陽イオンによる高い静電効果に基づくもの と思われる。

このようにクラウンエーテルは溶存状態で示す 選択的金属イオン錯形成能をベシクル表面でもそ のまま保持し、ベシクル粒子にイオンを選択的に 吸着する新しい機能を付与することがわかる。

次にPC量を一定にしてベシクル中のクラウン エーテル含有量を変化させた際のよー電位の変化 を調べた。Fig.-6は各種混合ベシクルをK\*イオ ンで吸着処理した際の結果を示す。クラウンエー テル含有量が多くなるほどK\*イオンの錯形成量



 $\bigcirc$ ; PC + crown=1:1,  $\triangle$ ; PC + crown=1:0.5,  $\triangle$ ; PC + crown=1:0

Fig. 6 ¢ -Potential of PC+crown vesicles with different component fractions in KCI aqueous solutions.

が増大して, ζ-電位は正側へ大きく変化するこ とがわかる。

Fig.-7は添加塩としてBa<sup>2+</sup>を用いた場合の結 果である。Ba<sup>2+</sup>は二価陽イオンであると同時に クラウンエーテルと最も錯形成安定度が高いため に10<sup>-5</sup>mol・dm<sup>-3</sup>の低濃度で既に正のζ-電位 を示し、濃度の増加と共に大きく正側へシフトし ている。ここで興味深いことはいずれのクラウン エーテル混入ベシクルにおいても塩濃度の増加で 対イオンによるScreening効果が全く現れず単 調にζ-電位の増加のみが認められることである。 同様な傾向はO/W型エマルションを試料に用い た場合は認められない<sup>8)</sup>ことから、バックグラウ ンドとしてのPCの極性基がこの現象に関与して いることは確かであるが明確な説明を記述するこ



 $\Box$ ;PC + crown=1:2,  $\triangle$ ;PC + crown=1:1, O;PC + crown=1:0.5, ;PC + crown=1:0

Fig. 7  $\zeta$  -Potential of PC+crown vesicles with different component fractions in BaCl<sub>2</sub> aqueous solutions.

とは今のところできない。

Fig.-8はLi<sup>+</sup>イオンを添加した場合の結果を 示す。クラウンエーテルとの錯形成安定度が小さ く,混合ベシクル表面との相互作用が少ないため にクラウンエーテル含量の違いによるζ-電位の 変化はほとんど認められない。

# 3.4 PC+PS+crown 混合ベシクルと金属イオンの相互作用

次にリン脂質を2種類混ぜ合わせた混合ベシク ル系をクラウンエーテルで修飾した際の金属イオ ンの錯形成効果を調べた。リン脂質混合ベシクル はPCとPSを合わせた総量は常に一定として両 脂質の割合を変化させ、ここに一定量のクラウン エーテルを混入させてベシクルを調製した。



Fig. 8 *z* -Potential of PC+crown vesicles with different component fractions in LiCI

aqueous solutions.

Fig.-9に各種PC+PS混合ベシクル系および PC+PS+crown混合ベシクル系を様々な濃度の KC1水溶液で吸着処理した際の $\zeta$ -電位の変化を 測定した結果を示す。PC+PS混合ベシクル系で はPCとPSの組成を変化させてもKC1濃度によ る $\zeta$ -電位の変化の様子はあまり変わらず常に負 の $\zeta$ -電位を示すことがわかる。これはPCとPS のKC1に対する相互作用はあまり変わらないこ とを示す。一方PC+PS+crownの3種混合ベシ クル系ではPCとPSの混合の割合で $\zeta$ -電位の KC1濃度依存性は大きく変化する。すなわち, KC1濃度が増大すると、PS含有量に応じて $\zeta$ -電位は負側へ大きくシフトする。この際PS含量 の影響が極めて顕著であり、例えば10<sup>-3</sup>mol・ dm<sup>-3</sup>KC1濃度の溶液中で、リン脂質に1割のPS



(); PC + PS + crown=1:0:1, [; PC + PS + crown= 0.9:0.1:1, []; PC + PS + crown=0.5:0.5:1, (); PC + PS=1:0, ∆; PC + PS=0.5:0.5, ∆; PC + PS=0.9:0.1

を含有させるとよー電位はPS含量が零の系に比 べて20~30mV低下することがわかる。つまり, ベシクルの構成成分にPSを加えるとよー電位が 引き下がるという効果が現れるのはクラウンエー テルを混合した場合に限られることがわかる。

Fig.-10にLiClを添加した場合の3種混合ベシ クルに対する $\zeta$ -電位の測定結果を示す。クラウ ンエーテルとの錯形成能の低いLi<sup>+</sup>イオン添加の 場合はK<sup>+</sup>イオンの場合とは対照的にPC+PS混 合系およびPC+PS+crown混合ベシクル系共に PS含量の影響は現れないことがわかる。

このような PC+PS系では PSの影響が現れず, PC+PS+crown 混合ベシクル系で,かつクラウ ンエーテルと錯形成能の高い金属イオンを添加し



(); PC + PS + crown=1:0:1, ]; PC + PS + crown= 0.9:0.1:1, ]; PC + PS + crown=0.5:0.5:1, ]; PC + PS=1:0, ∆; PC + PS=0.5:0.5, ]; PC + PS=0.9:0.1

Fig.10 **c**-Potential of PC+PS + crown and PC + PS vesicles with different component fractions in LiCI aqueous sol utions.

た場合に限り PSを混合した効果が現れるという, クラウンエーテル基の錯形成が関与したベシクル 表面での特異な界面動電現象について次のように 考察した。

まず、PSがベシクルのζ-電位を負側へ引き 下げる効果を示すのはPSはPCと違って分子構 造中にカルボキシル基を持っており、これが溶液 中で解離して負電荷をもつカルボン酸イオンにな るためであることは容易に理解できる。また、 PSがζ-電位を低下させる度合いが金属イオン の種類や濃度によって異なるのはクラウンエーテ ルとのこれらイオンの錯形成がカルボキシル基の 解離に影響を与えるためであろう。すなわち、 Fig.-11の模式図で示すようにベシクル表面に存



Fig.11 Schematic picture showing the surface structure of PC + PS + crown vesicle.

在するクラウンエーテル基が金属イオンとの錯形 成によって正に帯電すると、その静電効果によっ て同様にベシクル表面に存在する PSの負のカル ボキシル基の解離を促進するものと思われる。さ らに電気泳動のと-電位は粒子表面からある距離 離れたところ, すなわち Slipping plane におけ る電位であるから、カルボキシル基が幾分外水相 側へ突き出していれば PSの含まれる比率が小さ くても効果的にと-電位を引き下げることは可能 であろう。このような考えはPC+PS+crown 混 合ベシクル系にBa<sup>2+</sup>を添加した系にも適用でき る。その結果をFig.-12に示す。K<sup>+</sup>イオンに比 べBa<sup>2+</sup>イオンを添加した場合はより低濃度領域 でPSの混合による効果が認められる。Ba<sup>2+</sup>イ オン濃度を高めると PSの混合効果が小さくなる のは、カルボン酸イオンの負の電位効果よりも Ba<sup>2+</sup>とクラウンエーテル基の錯形成定数が大き く、かつ二価イオンであるために正の電位効果が より強いためと考えられる。

#### 4. 結 論

長い炭化水素鎖をもつクラウンエーテル( $C_{18}$ -OCH<sub>2</sub>-18-crown-6)と極性基の異なるリン脂 質PCおよびPSをいろいろな割合で混合したベ シクルを作製し、クラウンエーテル基の持つ金属 イオン選択性錯形成挙動がベシクル粒子の表面で いかに現れるか、またPCとPSの混合比を変え



 $\bigcirc$ ; PC + PS + crown=1:0:1,  $\blacksquare$ ; PC + PS + crown= 0.5:0.5:1,  $\bigcirc$ ; PC + PS=1:0,  $\triangle$ ; PC + PS=0.5:0.5

Fig.12 ζ -Potential of PC+PS + crown and PC + PS vesicles with different component fractions in BaCl<sub>2</sub> aqueous solutions.

て粒子表面の電位効果を変化させるとクラウン エーテル基の錯形成挙動がどのように影響を受け るかを調べるために,種々な溶液条件下でベシク ルのζ-電位を測定し,次のような結論を得た。

- PCやPSにいろいろな割合でC<sub>18</sub>-OCH<sub>2</sub>-18-crown-6を混合した場合でもラメラ構造 を有する単分散性の高いベシクルが調製され た。また、クラウンエーテル基が溶液中で有 する選択的金属イオン錯形成能はベシクル表 面でもそのまま保持され、ベシクル粒子に金 属イオンを選択的に吸着する新しい機能を付 与することができる。
- PC+crownの混合ベシクルは錯形成安定度 の高いK<sup>+</sup>やBa<sup>2+</sup>の水溶液中において、それ らのイオン濃度を増大させてゆくと大きな正

のζ-電位を示すが,対イオンによる Screening効果は現れず10<sup>-2</sup>mol・dm<sup>-3</sup>近 辺まで単調にζ-電位を増加させる。

3) PC+PS+crownの混合ベシクルは錯形成安定度の高いK\*やBa<sup>2</sup>\*を含む水溶液中でのみ、 PS含量のわずかな増加でよ-電位を負側へ大きくシフトさせる。このような現象はクラウンエーテルと錯形成能の低い金属イオンを添加した場合やPC+PS混合ベシクル系では認められないことから、クラウンエーテルへの金属イオンの錯形成とPSの極性基が関与した特異な複合現象と言える。

## 文 献

 S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science*, 175, 720 (1972)

- 2) K. Furusawa, H. Kakoki, M. Matsumura, Bull. Chem. Soc. Jpn., 57, 3414(1984)
- 3)妹尾 学, "膜の化学", 大日本図書㈱, (1987)p. 114
- 4) 古澤邦夫, 鹿子木宏之, 武居俊明, 日化, 1984, 992
- 5) E. J. W. Verway, J. Th. G. Overbeek, "Theory of the Stability of Lyophobic Colloid" Elsevier, Amsterdam(1948)
- 6) R. M. Izatt, D. P. Nelson, J. H. Rytting B. L.
  Haymore, J. Am. Chem. Soc., 93, 1619(1971)
- 7) J. Marra, Biophys. J., 50, 815(1986)
- 8) 古澤邦夫,小幡千春,松村英夫,桑村常彦,日本 腹学会第11年会講演要旨集,55(1989)