

脂質エマルション表面単分子膜とリポソーム表面2分子膜の示す顕著なバイオ機能の差異——血漿アポリポ蛋白質の認識について——

京都大学大学院 薬学研究科

半 田 哲 郎

Triacylglyceride (TG)/phosphatidylcholine (PC) -emulsions and PC-vesicles are protein-free models for TG-rich plasma lipoproteins and biological membranes, respectively. Both have been utilized for drug delivery systems. We have found that PC monolayers of emulsion particles and PC bilayers of vesicles have different interfacial properties and metabolic fates in animal plasma. In this study, plasma apolipoprotein binding to emulsion and vesicle particles are studied in terms of interaction between amphiphilic helices of apolipoproteins and surface PC layers of the lipid particles, and the physiological relevance of the results is discussed. Binding amounts of apoC-2 and apoE to PC/TG-emulsions were about 10 times larger than those to PC-vesicles in plasma. Accordingly, the plasma-clearance of emulsions through apoE receptors was more rapid than vesicles in rat. The maximum binding amount of the isolated apoA-1 was 4 times larger for emulsions than vesicles. Apolipoproteins are thought to interact surface PC layers of lipid particles with the amphiphilic helices nestled between the PC head groups. The different binding capacities between emulsions and vesicles are explained by the interaction of surface (PC) and core (TG) lipids. Although binding of apolipoproteins to surface PC layers may produce the packing defects, the penetration of TG into the surface monolayers of emulsions could fill the packing defects, resulting the increased binding capacity.

1 緒 言

トリグリセライド-rich な血漿リポ蛋白質、カイロミクロン (Chylomicrons) や VLDL は脂質エマルションを基本構造としている。その代謝過程で種々の可溶性のアポリポ蛋白質の結合が変化し、これがトリグリセライドの分解 (リポリシス) やレセプターを経由した細胞取り込みを調製すると考えられる¹⁾。アポリポ蛋白質の脂質表面膜に対する親和性は、リポ蛋白質のみならず人工のエマルションの体内動態にも重要である。我々は、リポ蛋白質の代謝過程での脂質組成の変化が可溶性アポリポ蛋白質との親和性を変化させ、その代謝を制御すると位置づけている。実際、エマルションを利用して、一部これを証明してきた^{2~6)}。2分子膜 (リポソーム or ベシクル vesicles) とレシチン単分子膜 (エマルション emulsions) は、それぞれ生体膜と動物血漿リポ蛋白質の蛋白質フリーモデルと考えられる (Fig. 1 参照)。単分子膜 (monolayers) と2分子膜 (bilayers) では、血漿アポリポ蛋白質 apoA-1、ApoC-II、および apoE の結合性に著しい差異があり、これに応じて動物血漿中での代謝が変化する。また、膜へのコレステロールの添加も、apoA-1 の結合に対し単分子膜と2分子膜では逆方向の効果を示す。これらの結果に、脂質粒子の表面膜とコアの物理化学的研究をあわせ、エマルションとベ

シクル粒子への血漿アポリポ蛋白質選択的結合のメカニズムを考察する。特に、脂質表面膜の両親媒性構造とアポリポ蛋白質のヘリックスの両親媒性構造の適合性、表面膜の水和など、アポリポ蛋白質の選択制や活性化に重要な因子について議論する。なお、本研究では、エマルションやベシクル粒子径を一定 (約 100nm) に保って比較した。

2 実 験

エマルションとリポソームの調製 エマルションのコアを形成する中性脂質トリグリセライド (triolein, **TO** or **TG**)、またはコレステリルオレート (**CO**) を、エマルション表面単分子膜を構成する卵黄レシチン (**PC**)、あるいはこれとコレステロール (**Chol**) の混合物を (乳化剤として) 用い、粒子径約 100nm のエマルションを調製した (高压乳化機: 800 ~ 1300 気圧)。共存するリポソームは超遠心法で取り除いた²⁾。リポソームは、PC あるいは PC-Chol 混合物を水溶液に分散し、これを 100nm のポアを持つポリカーボネート膜に押し出して調製した (Extrusion method)²⁾。

膜流動性の評価 エマルションのコアは蛍光プローブ 1,6-diphenylhexatriene (DPH) で、表面 PC 膜はそのカチオン性誘導体 TMADPH あるいはリン脂質誘導体 DPHpPC で、それぞれ標識し、蛍光異方性を測定して流動性を評価した。また、ナノ秒時間分割蛍光異方性の測定も行った^{2, 3)}。

膜中の Chol の位置 蛍光性の Chol アナログ dehydroergosterol (DHE) で Chol の一部を置き換え、水溶性の NaI で蛍光を消光し、これを解析して単分子膜と2分子膜中の Chol のロケーション (メジウムへの露出度) を評価した³⁾。

アポリポ蛋白質の結合性 ヒト serum 中の apoC-II と apoE のエマルションとリポソームに対する (飽和) 結合量を、1 次元免疫拡散法によるアポリポ蛋白質定プレート



Distinct Plasma Apolipoprotein-Interactions with Emulsion Monolayers and Vesicle Bilayers

Tetsurou Handa

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

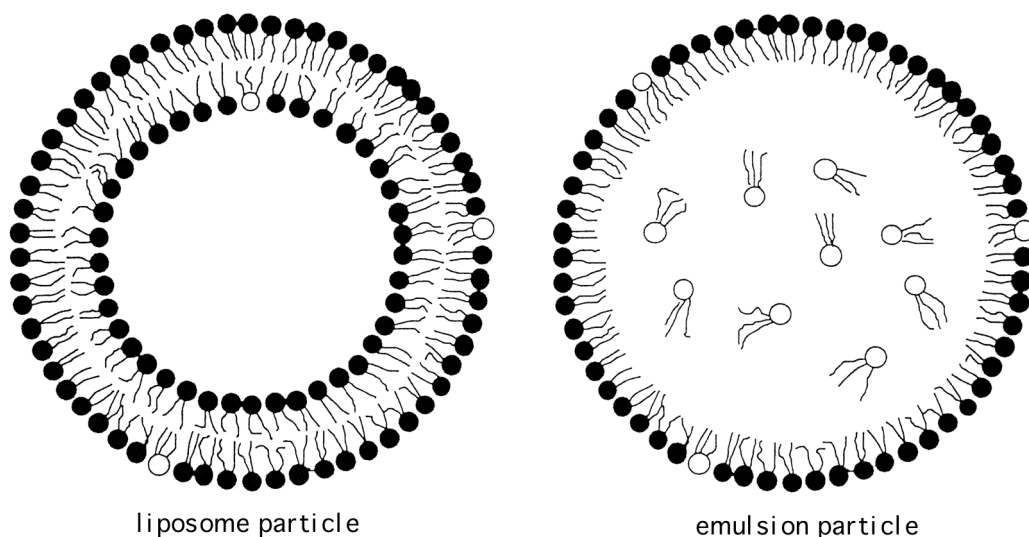


Fig. 1 TO-PC emulsions (PC monolayers) and PC liposomes (PC bilayers)

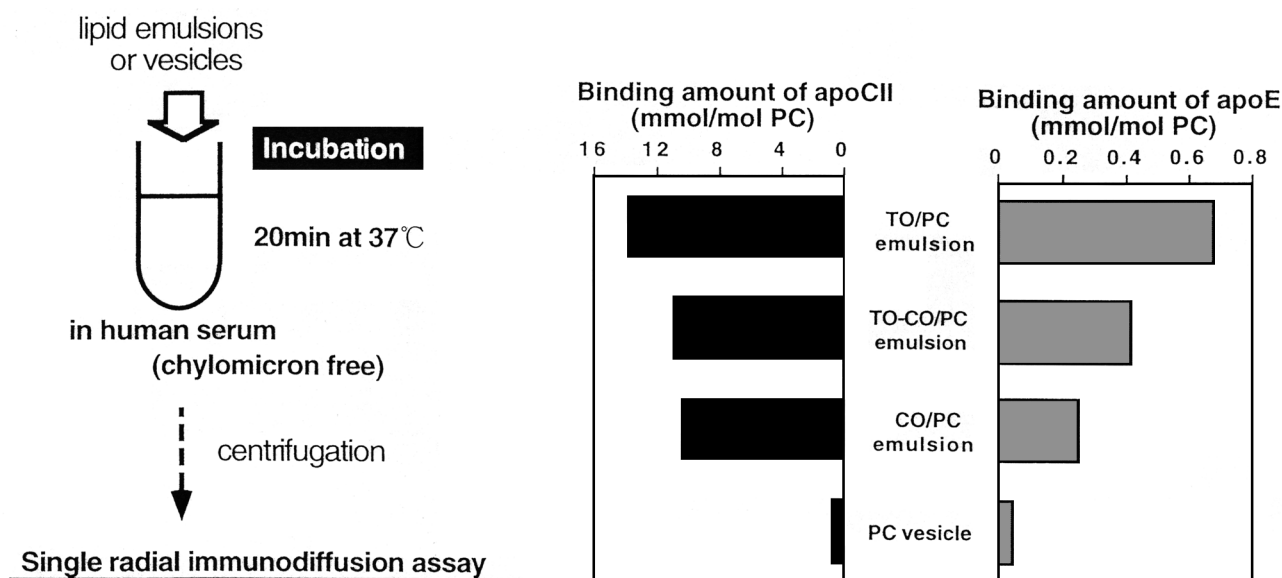


Fig. 2 apoC-II and apoE binding to emulsions and vesicles in human serum

を用いて測定した^{3, 4)}。単離した apoA-1 や apoE の結合等温線は、脂質粒子を分離する前後のメデウム中のフリー蛋白質を蛍光 (tryptophan) 分析して求めた⁵⁾。

ウイスター系ラット血中からの (蛍光脂質 cholesteryl 1-pyrene decanoate で標識した) 脂質粒子の肝臓取り込みによる消失 (クリアランス) は、粒子投与後の血中の蛍光脂質を追跡して評価した^{4, 6)}。

3 結果と考察

Fig. 2 は、TO/PC-、CO/PC-、TO-CO/PC-emulsions と PC-liposomes (vesicles) に対する、apoC-II と apoE の serum 中での飽和結合量を示す。apoC-II と ApoE の結合量は、共にエマルション (PC 単分子膜) に比較してベシクル (PC 2 分子膜) では 10 分の 1 以下に低下している。また、エマルションのコアの脂質を液体の TO から液

晶の CO に置き換えると、apoC-II と ApoE の結合量が減少することも認められる。なお、ここで、apoC-II は血漿リポ蛋白質 (エマルション) コアの TG を加水分解する酵素 LPL の活性化因子 (ペプチド) であり、apoE は、肝臓実質細胞の LDL やレムナント (remnant) レセプターの特異的リガンド蛋白質である³⁾。

Fig. 3 は、ラット血中に投与されたエマルションとベシクルが肝臓の取り込みにより血漿中から消失される様子を示す。粒子径は 100nm と同じであるが、TO/PC-emulsions > TO-CO/PC-emulsions > CO/PC-emulsions > PC-vesicles の順に肝臓への移行が速い。この順序は、Fig. 2 で示された apoE の結合性の順序と一致する⁷⁾。

Fig. 4 は、エマルション表面 PC 単分子膜とコアの堅さを、蛍光異方性をより評価した結果である。TO を CO で置き換えるとコアの蛍光異方 (すなわち、堅さ) は高くな

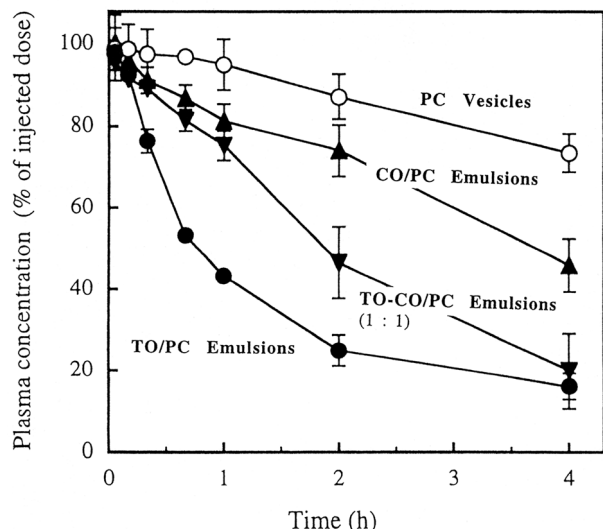


Fig. 3 Clearance of emulsions and vesicles in rat blood

るが、PC 表面単分子膜の堅さは一定である⁷⁾。それでは、コアの組成によりアポリポ蛋白質の表面膜結合性や (Fig. 2) 血中からの消失 (Fig. 3) が変化するのどのようなメカニズムによるのであろうか？ これを考察する前に、単離した apoA-1 のエマルションとベシクルへの結合性を見てみよう。

apoA-1 は、動物体内でコレステロールの代謝に重要な役割をはたしている。この蛋白質は Fig. 5 に示されるように、7～8 本の両親媒性 α -ヘリックス (amphiphilic helices) から構成されており、水中ではこれらのヘリックスは球状蛋白質へと畳み込まれている。脂質粒子表面では、apoA-1 の高次構造はほどけ、両親媒性ヘリックスは PC

分子間に挿入されると考えられている。

Fig. 6 に示すように、単離した apoA-1 もエマルションの PC 単分子膜の方が圧倒的に高い結合量を示した (右図)⁵⁾。また、コアを液体の TO から液晶の CO の置き換えと、アポリポ蛋白質の結合量が減少した (左図)⁵⁾。アポリポ蛋白質の粒子への結合は、表面 PC 単分子膜上のイベントである。コア脂質はどのように関与するのであろう？

Fig. 7 に、アポリポ蛋白質と PC 膜の相互作用の模式図を示す。アポリポ蛋白質の脂質結合部位は両親媒性の α -helix である。PC 分子の臨界充填パラメータは約 1、自発的曲率はほぼ 0 である⁸⁾。また、脂質粒子は 100nm なので、粒子表面は分子レベルでは平面と見なせる。血漿アポリポ蛋白質の両親媒性ヘリックスは、一般に、親水面が大きく親油面が小さい (親水性の高い) 構造を持つので⁹⁾、表面膜に結合して + の曲率 (positive curvature) あるいは + の曲げ (positive bending) をもたらす。この膜の曲げは、表面エネルギーを高め²⁾、蛋白質を脱着させる方向に

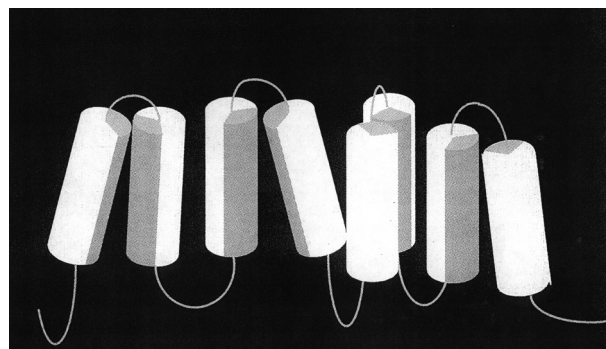
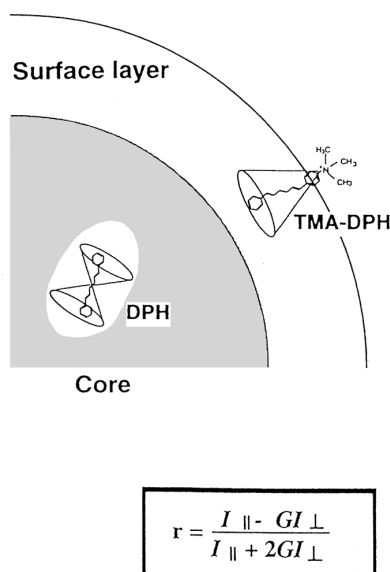


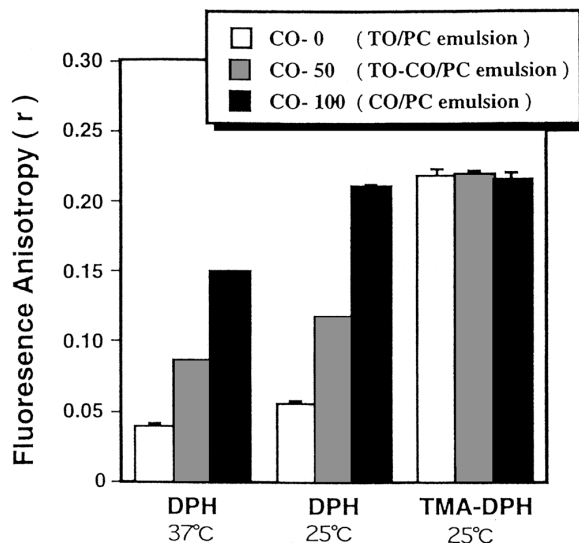
Fig. 5 Plasma apoA-1 in the unfolded state



$I_{\parallel}$: parallel fluorescence components

$I_{\perp}$: perpendicular fluorescence components

Fig. 4 Fluorescence anisotropy or rigidity of surface layer and core of emulsion particles



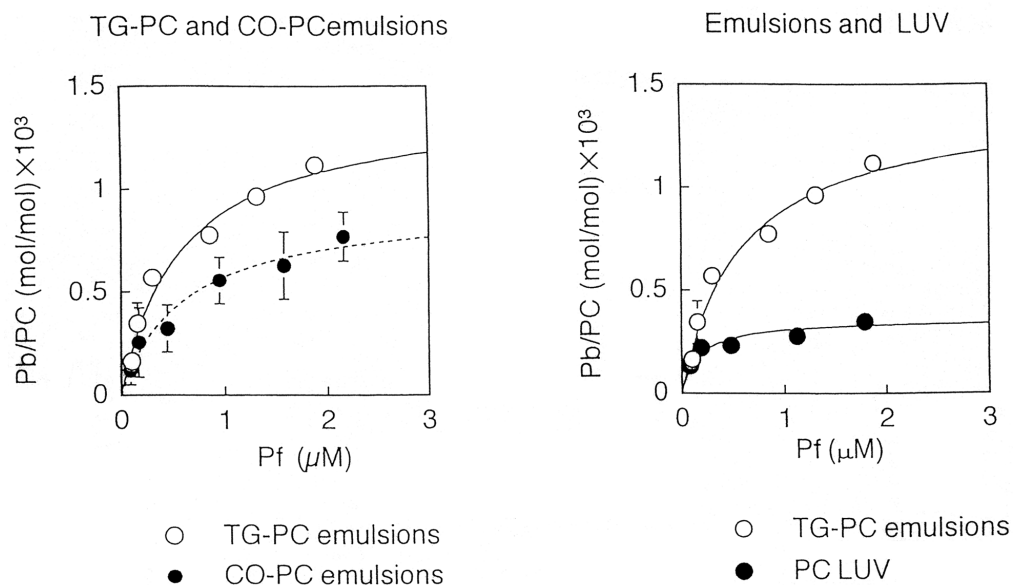
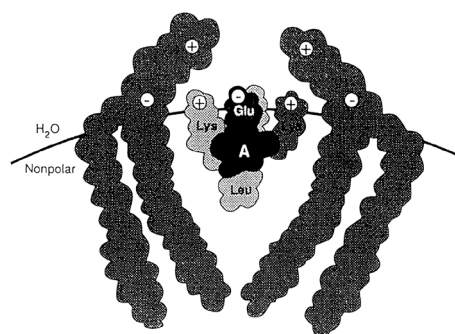


Fig. 6 ApoA-1 binding to emulsion and vesicle particles

作用する。エマルション（PC 単分子膜）はコアに中性脂質（親油性の TO）を有し、その表面膜への移動は-の曲げ（negative bending）を誘導し、蛋白結合による膜のフラストラシオンを緩和する。

コアを持たないベシクル（PC 2 分子膜）では、このような曲げエネルギー低減効果は期待されない。また、エマルションのコアを液体の TO から液晶の CO に置き換えると、中性脂質の表面膜への移動が抑制され表面フラストラシオンの緩和も減弱する。

Fig. 8 では、エマルションとベシクルへの apoA-1 の結合に対する Chol の効果を示す。TG-PC エマルション表面の PC 単分子膜へ Chol を 20mol% 以上添加すると apoA-1 の結合は減少する⁵⁾。40mol% の Chol は蛋白結合量を半分



The long axis of the helix is perpendicular to the plane of the figure, from Segrest et al., 1994

Fig. 7 Interaction between amphiphilic helix of apolipoprotein and PC molecules at surface layer

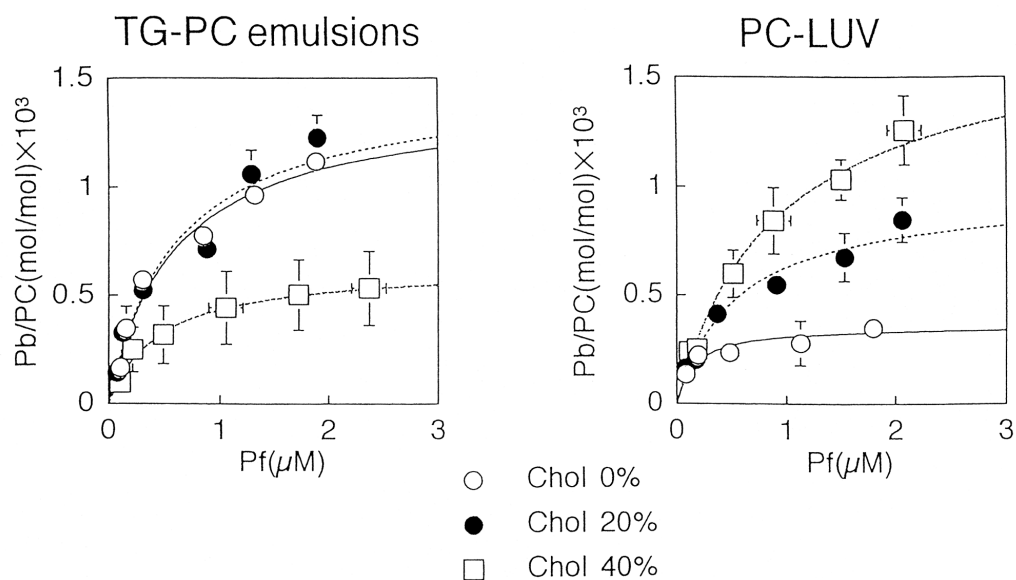


Fig. 8 Distinct effects of Chol on apoA-1 binding between emulsions and vesicles

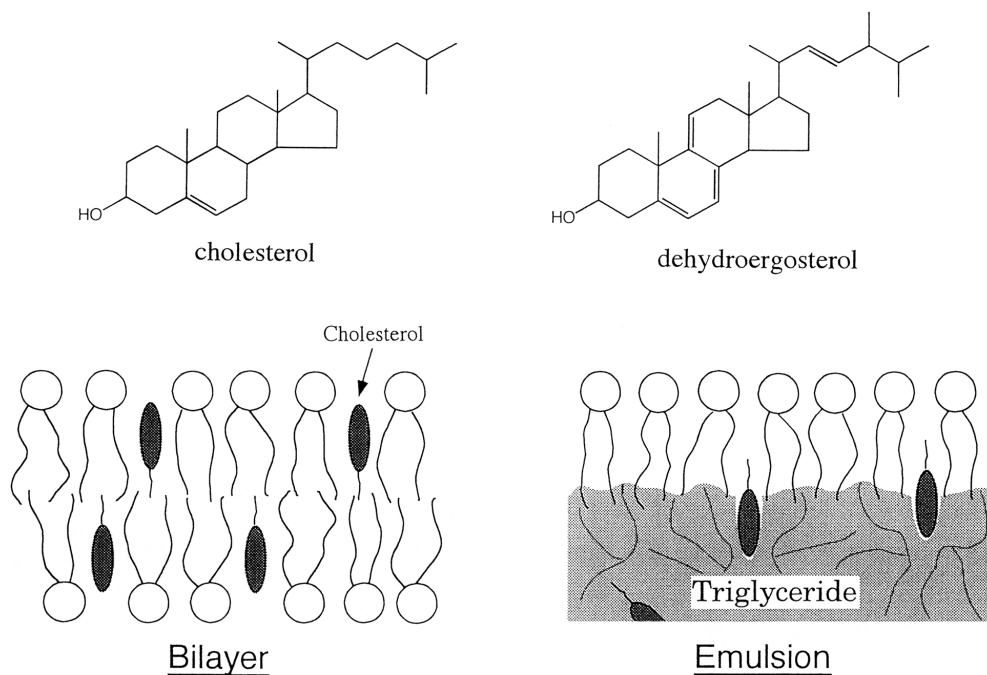


Fig. 9 Chol in PC bilayers and emulsion PC monolayers

に減少する。一方、PC ベシクル 2 分子膜への Chol の添加は apoA-1 結合量を急増させる⁵⁾。40mol% の Chol は結合量を 5 倍にまで上昇させる。このように、エマルションとベシクルでは Chol の効果は逆転する。

Fig. 9 で apoA-1 の結合に対する、エマルションとベシクルでの対照的な Chol の効果を考察しよう。エマルション表面の PC monolayers とベシクルの PC bilayers 中の Chol のごく一部を、蛍光性の Chol アナログ、dehydroergosterol (DHE) で置き換える。水溶性の蛍光消光剤 NaI による膜中の DHE の消光実験の結果、DHE (Chol) は PC bilayers では水溶液に接して存在するが (左下図)、PC monolayers では膜のより内側に取り込まれ、水溶性の消光剤に完全には曝されていない (右下図) ことがわかった³⁾。ベシクルの PC 2 分子膜はそれ自身のアポリポ蛋白質の結合容量は小さいが、自発的曲率が負の Chol は - の曲げを表面に誘導し、蛋白質による膜の + の曲げを相殺する。これにより、表面フラストレーションも緩和され、アポリポ蛋白質結合容量が増大すると考えられる。

Fig.10 は、apoA-1 により誘起される蛍光色素 calcein のベシクル 2 分子膜からの漏出を示す。apoA-1 が外水相にないとき、蛍光色素の漏れは認められない。動物血漿中のフリー濃度に相当する $4\mu\text{M}$ apoA-1 により、PC vesicle bilayers から急速に大量の蛍光色素が漏出する。PC bilayers に 40mo% の Chol を添加するとこの漏出は大幅に抑制される。一方、apoA-1 の結合量は、Chol 含有ベシクルのほうが PC のみのベシクルより 5 倍も大きい⁵⁾ (Fig. 8 参照)。この結果より、アポリポ蛋白質と脂質 2 分

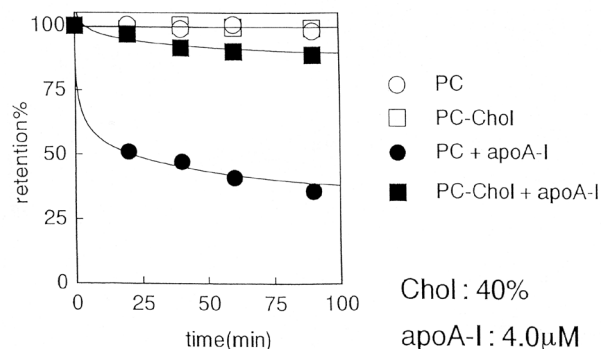


Fig.10 ApoA-1 induced leakage of calcein out of vesicles

子膜からなる超分子構造 (Fig. 7) の形成に Chol が重要な役割をもっていると推定され、血漿中の Chol 代謝とも関連して注目される。

4 総括

- 4.1 エマルション表面の PC 単分子膜は、ベシクル 2 分子膜に比べアポリポ蛋白質の結合容量が大きい。TO-PC エマルションは動物血中では PC ベシクルより速く (apoE レセプター経由で) 肝に取り込まれる。
- 4.2 エマルションコアの TO を CO に置き換えると、アポリポ蛋白質の結合容量が低下し、動物血中での肝取り込も遅延する。
- 4.3 アポリポ蛋白質の PC 表面膜結合は膜に + の曲げをもたらす。TO-PC エマルションでは TO がコアから表面膜へ移行して、表面膜に - の曲げを誘起しこれを打ち消す。
- 4.4 Chol は、アポリポ蛋白質の結合に関して、エマル

ション表面の PC 単分子膜とベシクル 2 分子膜で逆の効果を示す。PC 2 分子膜では Chol は - の曲げを誘起して、アポリポ蛋白質の誘起する + の曲げを打ち消す。PC 単分子膜では Chol は膜とコアの境界に局在し、アポリポ蛋白質の結合容量を低下させる。

4.5 また、エマルション表面にスフィンゴミエリンを添加するとアポリポ蛋白質や TG を分解する LPL の結合性を低下し、その代謝に顕著に影響することも明らかになった¹⁰⁾。

(参考文献)

- 1) 例えば, A M. Gotto, Jr et al., **Method Enzymol.** **128**, 3-31 (1986)
- 2) H. Saito, K. Nishiwaki, S. Ito, T. Handa, K. Miyajima, **Langmuir** **11**, 3742-3747 (1995)
- 3) H. Saito, T. Minamida, I. Arimoto, T. Handa, K. Miyajima, **J. Biol. Chem.** **271**, 15515-15520 (1996)
- 4) I. Arimoto et al., **Lipid** **33**, 773-779 (1998) ; I. Arimoto, M. Fujita, H. Saito, T. Handa, K. Miyajima, **Colloid Polymer Sci.** **275**, 60-66 (1997)
- 5) H. Saito, Y. Miyako, T. Handa, K. Miyajima, **J. Lipid Res.** **38**, 287-294 (1997)
- 6) T. Handa, Y. Eguchi, K. Miyajima, **Pharm. Res.** **11**, 1283-1287 (1994)
- 7) Saito et al, **J. Lipid Res**, submitted.
- 8) A. Kabalnov et al., **Langmuir**, **12**, 276-292 (1996) : **J. Colloid Interface Sci.** **184**, 227-235 (1996)
- 9) J. P. Segrest, D. W. Garber, C. G. Brouillette, S. C. Harver, G. M. Anantharamaiah, **Adv. Protein Chem.** **45**, 303-369 (1994)
- 10) I. Arimoto, H. Saito, Y. Kawashima, K. Miyajima, T. Handa, **J. Lipid Res.** **39**, 143-151 (1998)