

ミセル-ベシクル転移機構及びベシクルの粒子径と流動性の制御

柏木 寛,* 上野雅晴

Mechanism of Micelle-Vesicle Transformation and Control of Vesicular Sizes and Properties

Hiroshi KASHIWAGI* and Masaharu UENO

Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama City 930-0194, Japan

(Received November 1, 2007)

The mechanism of vesicle-to-micelle or micelle-to-vesicle transition was studied in order to control sizes and fluidities of vesicles during periods of preparation. Dependence of particle sizes measured by quasi-elastic light scattering, turbidities, fluidity parameters monitored by ESR spectroscopy, and morphological changes of mixed aggregates of egg yolk phosphatidylcholine (EPC) and a detergent (octylglucoside (OG) or sodium cholate (Na-chol)) on detergent concentration provided a model of vesicle destruction. It possessed three phase transition points, and proceeded in a step-wise fashion: vesicles, small particles containing large amounts of detergents (SUV*), intermediate structures, and mixed micelles. Vesicle formation on removal of detergents from micelles proceeded oppositely. Micelle-vesicle transition mechanism was common to all detergents examined. The feature of the mechanism was the presence of SUV*. Next, SUV* was prepared by adding appropriate amount of a detergent to small unilamellar vesicles obtained by sonication. Time-dependent size growth of the SUV* was remarkable in the case of OG-containing SUV*, but was insignificant in the case of Na-chol-containing SUV*, suggesting the size determining step to be the stage of the SUV*. The tendency to produce large or small vesicles from micelles was related to the absence or presence, respectively, of a net charge in the detergent molecule. The fluidities of EPC micelles containing small amounts of a detergent possessing a steroidal structure (*e.g.*, Na-chol or CHAPS) were significantly smaller than the corresponding values of a detergent without a steroidal structure (*e.g.*, OG), suggesting a method of control of orderliness of hydrocarbon chains in EPC vesicles.

Key words—micelles; vesicles; detergent; sizes; fluidity**1. はじめに**

リポソーム（リン脂質ベシクル）と密接に関連する研究では、膜タンパク質の可溶化と再構成、細胞膜モデルとして膜タンパク質の機能や構造の解析、人工細胞や人工膜ワクチンなどへの応用研究が多数報告されている。¹⁻⁷⁾そして、膜タンパク質の再構成の効率はタンパク質自身の物性以外に、ミセル-ベシクル転移の重要性が指摘された。⁸⁾

一方、医薬品を生体の必要部分に送達し、そこでの放出速度を制御することにより、医薬品の投与量が減少し、副作用の軽減が期待される。リポソーム

は内部に水溶性と脂溶性の薬物を封入でき、生体物質であるリン脂質を材料としているので、副作用の少ない薬物担体として注目されている。また、生体に投与されたりポソームの体内動態にはサイズ⁹⁻¹²⁾が、膜中に再構成されたタンパク質の配向性には流動性の重要性が推測される。

混合ミセルから界面活性剤を除去して調製されたリポソームのサイズや物性は、界面活性剤の種類や除去法に依存することが知られていた。¹³⁻¹⁵⁾従来、調製時におけるリポソームのサイズの制御は経験的に行われた。例えば、界面活性剤としてコール酸ナトリウム (Na-chol) を用いると小さなベシクルが得られた。一方、オクチルグルコシド (OG) を用い、OGを透析法により長時間を掛けて除去すると大きなベシクルが、ビーズ法によって短時間のうちに除去すると小さなベシクルが得られる傾向があっ

富山大学大学院医学薬学研究部（薬学系）(〒930-0194 富山市杉谷 2630)

*e-mail: kasiwagi@pha.u-toyama.ac.jp

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウム S31 で発表したものを中心に記述したものである。

た.¹³⁻¹⁵⁾ リポソームを薬物送達システムの素材として用いるためには、調製段階で粒子径や性状を制御する必要があり、それを実現するためには、ミセル-ベシクル転移に関する知見が有効である。ミセル-ベシクル転移機構については、これまでに様々な研究がなされてきた。¹⁶⁻²⁹⁾ しかし、研究者により試料や実験条件が異なるので、すべての場合を網羅するような転移機構は提出されていない。

われわれは卵黄ホスファチジルコリン (EPC) の大きな1枚膜ベシクル (LUV) の界面活性剤 OG による可溶化に関する研究を行った。すなわち、OG を含む EPC の LUV について、準弾性光散乱法による粒子径、濁度 (光学密度)、スピラベル法による流動性パラメーターを中心とする物性測定、及び電子顕微鏡写真を用いる形態変化の観察を行い、ミセル-ベシクル転移機構について検討した。その後、調製時におけるリポソームの粒子径と流動性の制御に関連する知見を得た。

2. 卵黄ホスファチジルコリンベシクルのオクチルグルコシドによる破壊機構^{13,26,29)}

押し出し法により調製した直径約 200 nm の EPC の LUV 懸濁液に既知量の OG を添加した混合凝集系を用いて、準弾性光散乱法により粒子径、濁度 (500 nm における光学密度)、5-doxylstearic acid (5-DS) の ESR スペクトルより算出したオーダーパラメーターを界面活性剤濃度の関数として測定した。脂質濃度は常に一定 (5 mM) に保った。また、凍結割断電子顕微鏡写真を用いて OG の添加によ

る LUV の形態変化を観察した。

Figure 1 (A)には光学密度 (濁度)、Fig. 1 (B)には相対粒子径の全 OG 濃度に対するプロットを示す。ここで相対粒子径 (D_x/D_0) は膜中の OG 濃度が Re のときの粒子径 D_x と、 $Re=0$ のときの粒子径 D_0 の比である。また、 Re は (膜中の OG のモル数) / (脂質のモル数) である。Figure 1 をみると、濁度と相対粒子径の OG 濃度に対する変化は単調ではなく、少なくとも3つの共通の屈曲点を持つことが分かる。これより、OG によるベシクル破壊過程は少なくとも3つの相転移点を有することが分かる。Figure 1 (B)の破線は、ベシクル中に分配された OG が、脂質と相互作用しないで、単に球の表面積を増加させるものと仮定して計算した理論的な相対粒子径で、

$$D_x/D_0 = (1 + Re/2)^{1/2} \quad (1)$$

で計算される。²⁹⁾ Figure 1 (B)をみると、OG 濃度が 0-13 mM の範囲では、 D_x/D_0 の測定値は Eq. (1) の理論曲線上に乗るので、この範囲では OG は EPC 分子と相互作用しないで単純に LUV 中に分配されるものと考えられる。OG 濃度 13 mM では濁度と相対粒子径の濃度変化の屈曲点が一致している。OG 濃度が 13-20 mM の範囲では、濁度も相対粒子径も減少している。また、 D_x/D_0 の測定値は理論曲線上に乗っていない。OG 濃度が 20-30 mM ではベシクルでもミセルでもない透明な液体が生成する。見掛け上大きな粒子径が観測されるのはこの液体の粘性が大きいためである。この範囲の構造体を中間

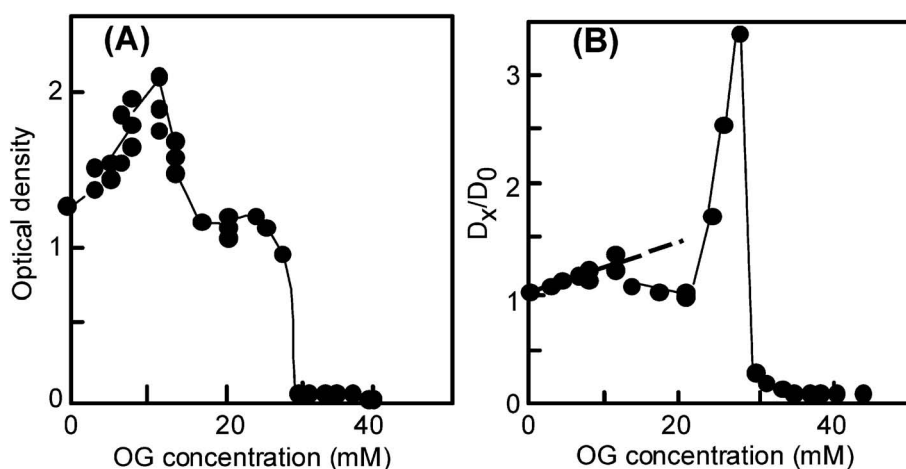


Fig. 1. Plots of Optical Density Obtained at 500 nm (A) and Relative Particle Diameter, D_x/D_0 (B), against OG Concentration. The broken line in (B) represents the theoretical line $[D_x/D_0 = (1 + Re/2)^{1/2}]$.²⁹⁾

構造体（巨大ミセル）と呼ぶ。さらに、OG濃度が30 mM以上では濁度も粒子径も小さく、系は透明で、ミセルが生成するものと考えられる。

次に、凍結切断電子顕微鏡写真を用いてEPC LUVのOGによる破壊の初期段階の形態変化を観察した。Figure 2はOGを含まないEPC LUV (A)、EPC/OG系で $Re=0.3$ (B)、1.38 (C)、及び2.38 (D)のときの電子顕微鏡写真を示す。Figure. 2(B)はOGがベシクル中に単純に分配される範囲（OG濃度：3.0 mM）の写真で、OGを含まないLUV (Fig. 2(A))よりも粒子径の大きなベシクルが観測される。 Re が増加して、Fig. 1で濁度と相対粒子径がともに減少する範囲（OG濃度：13–20 mM）では、LUVは小粒子の凝集体 (Fig. 2(C)) を経由して、小粒子の分散 (Fig. 2(D)) に変化する。

次に、EPC/OG系中に挿入した5-DSのESRスペクトルを測定し、得られた異方性のあるスペクトルより次式に従ってオーダーパラメーター (S) を算出した。

$$S = \frac{(A_{//} - A_{\perp})}{A_{ZZ} - 1/2(A_{XX} + A_{YY})} \quad (2)$$

ここで、 $A_{//}$ 及び A_{\perp} はそれぞれ超微細分裂定数の平行、及び垂直成分、 A_{XX} 、 A_{YY} 、及び A_{ZZ} は超

微細分裂テンソル A の3つの主値である。また、5-DSの場合、 $A_{ZZ} - 1/2(A_{XX} - A_{YY}) = 2.75$ mT である。

Figure. 3にはEPC/OG凝集系中の5-DSのオーダーパラメーターのOG濃度への依存性を示す。OG濃度が約20 mM以下では、オーダーパラメーターの値が大きく変化が少ない。EPC/OG系の流動性が小さいのは、系がラメラ構造を持つためと考えられる。特に、Fig. 1で D_x/D_0 が理論曲線上に乗る範囲のみではなく、粒子径や濁度が減少し、小粒子の凝集体が出現している範囲 (Fig. 2) でもオーダーパラメーターの値は大きく、系はラメラ構造を有することを示唆する。ここで生成した小粒子を超音波法で生成する小さな1枚膜ベシクル (SUV) と区別するために SUV* と名付けた。OG濃度が約20 mM ($Re=1.35$ に相当) 以上でオーダーパラメーターが急激に減少している (流動性が増加している) のは、リン脂質の炭化水素鎖中でラメラ構造の破壊が始まり、OG濃度が増加するほどラメラ構造の可溶化が進展することと対応する。

LUV/OG系について粒子径、濁度、オーダーパラメーター以外にも、OGのLUVへの分配挙動、高分子（ウロキナーゼ）のベシクル中への残存率な

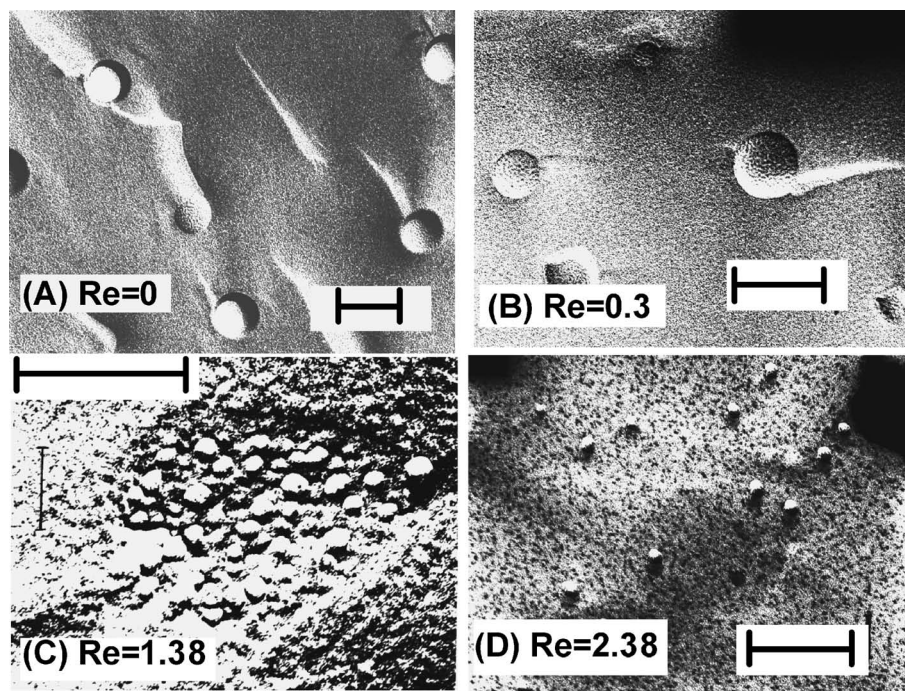


Fig. 2. Freeze Fracture Electron Micrographs of EPC/OG Aggregates at $Re=0$ (A), 0.3 (B), 1.38 (C), and 2.38 (D). The bars represent 200 nm. Re: represents OG/EPC molar ratio in membrane phase.

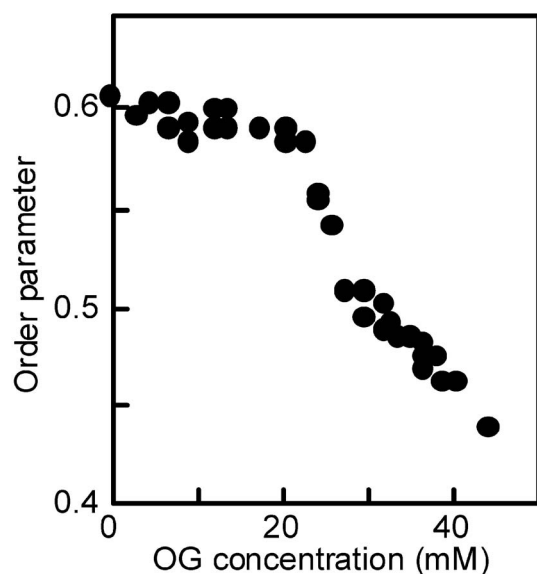


Fig. 3. Dependence of Order Parameter of 5-DS in EPC LUV/OG Aggregates on OG Concentration

どの物理量を測定した。その結果、測定方法が異なる複数の物理量の界面活性剤濃度への依存性には共通の屈曲点が少なくとも3つ見いだされた。以上のことを総合して、ベシクルの破壊機構は3つの相転移点を持ち、4段階で進行することが明らかになった。さらに、コール酸ナトリウム (Na-cho), octaethylene-glycol mono-*n*-dodecylether ($C_{12}E_8$) による EPC の LUV の破壊についても、上述と同様に、濁度、粒子径、オーダーパラメーターを測定し、凍結切断電子顕微鏡写真による形態変化を観察して検討したところ、ベシクルからミセルに変化するまでに3つの共通の屈曲点を有し、4段階で進行することが分かった。^{14,27)}

Figure 4 には OG, Na-cho, $C_{12}E_8$ による EPC LUV の破壊過程を模式的に図示する。Figure 4 をみると、LUV 破壊過程は用いた界面活性剤の種類に依存しないで、LUV \rightarrow SUV* \rightarrow 中間構造体 \rightarrow

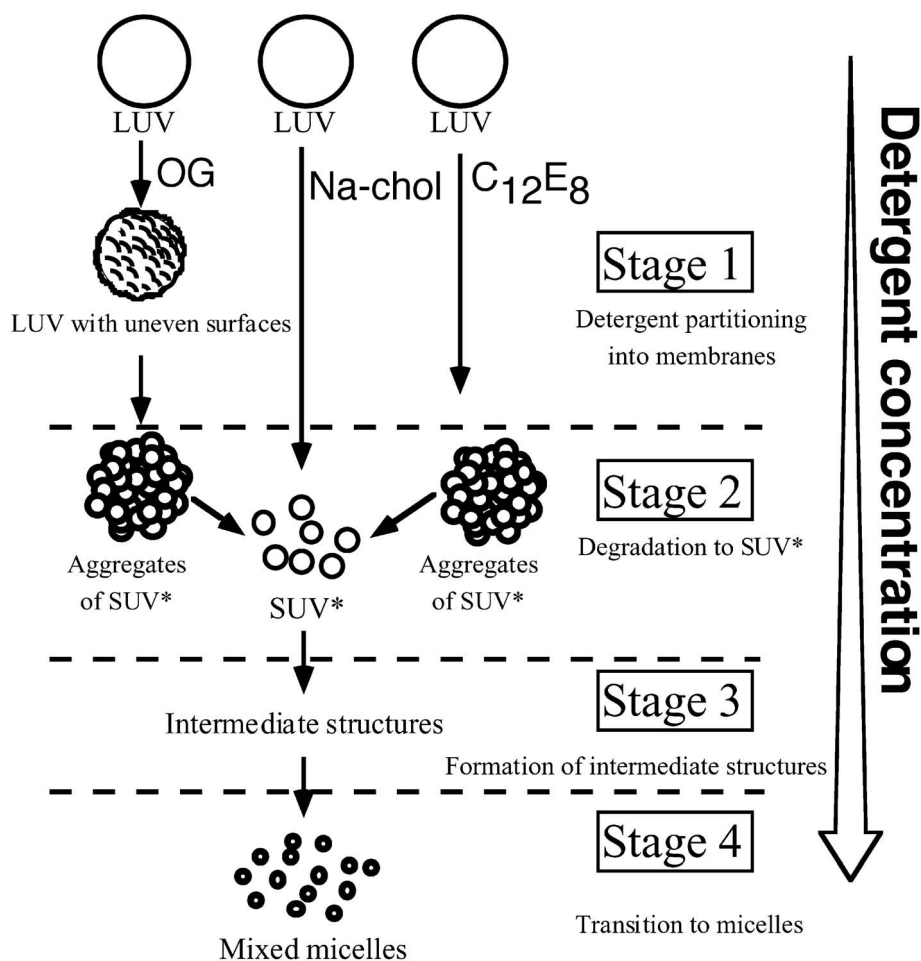


Fig. 4. Processes of Vesicle Destruction by Octylglucoside, Sodium Cholate, and $C_{12}E_8$

混合ミセルの順に進行する。OG と $C_{12}E_8$ 系の第 2 段階では SUV* の凝集が観測され、さらに界面活性剤濃度が増加すると小粒子の分散に移行する。一方、Na-cholesterol では小粒子の凝集体は出現しないで、小粒子の分散のみが観測される。われわれのベシクル破壊モデルは転移の途中に SUV* 段階の存在することが特徴である。一方、現在受け入れられている代表的なミセル-ベシクル転移機構には、Lichtenberg らによる三段階モデル³⁰⁾と Ollivon らによるその改良型モデル³¹⁾がある。これらのモデルでは混合ミセルから界面活性剤を除去するとラメラシートが生成し、その成長が調製時におけるベシクルサイズを決定した。

3. SUV* の性質と調製段階におけるリポソームサイズの制御

われわれの提案したミセル-ベシクル転移モデルでは転移の途中に SUV* が出現した。次に、SUV* の性質を明らかにするために、超音波法で EPC の SUV (直径約 40 nm) を調製し、適量の界面活性剤を添加して SUV* を作製した。これを用いて、準弾性光散乱法による平均粒子径を界面活性剤濃度と時間の関数として測定し (脂質濃度は 5 mM に固定)、SUV* の凍結切断電子顕微鏡写真を用いて、形態の時間変化を観察した。

Figure 5 には一連の過程 (SUV* の生成、放置、OG の除去) に伴う平均粒子径の変化を示す。Figure 5 をみると、超音波法で作製した SUV の直径は約 40 nm (A 点) である。これに適量 ($Re = 1.1$) の OG を添加し、SUV* を作製するとサイズは約 80 nm になる (B 点)。次にこれを 6 h 放置すると、著しいサイズの増加が観測される (C 点)。さらに透析法により 1 日掛けて OG を除去すると直

径約 120 nm のリポソームが生成する (D 点)。このように、SUV* の生成、放置、OG の除去という一連の過程により、出発時よりも約 3 倍のサイズを有するリポソームに変化する。ベシクル破壊の途中に出現する 4 つの段階のうち、EPC/OG 凝集系を放置することにより、顕著なサイズの増加を示したのは SUV* 段階のみであった。

Figure 6 (A) には EPC/Na-cholesterol 系、Fig. 6 (B) には EPC/3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) 系の平均粒子径の界面活性剤濃度と時間への依存性を示す。アニオン型界面活性剤 Na-cholesterol を含む SUV* (Na-cholesterol 濃度: 2–4 mM) では粒子径の経時的な増加は少ない (Fig. 6A) が、正味の電荷を持たない両性イオンの CHAPS を含む SUV* (CHAPS 濃度: 2–4 mM) では粒子径の増加が顕著である。実際、EPC/Na-cholesterol の SUV* から Na-cholesterol を除去すると小さなベシクルが、EPC/CHAPS の SUV* から CHAPS を除

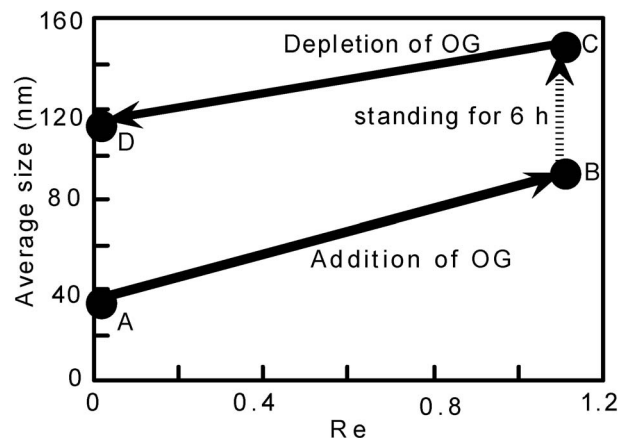


Fig. 5. Size Change of Liposomes in the Process of Adding OG, Standing, and Removing the OG

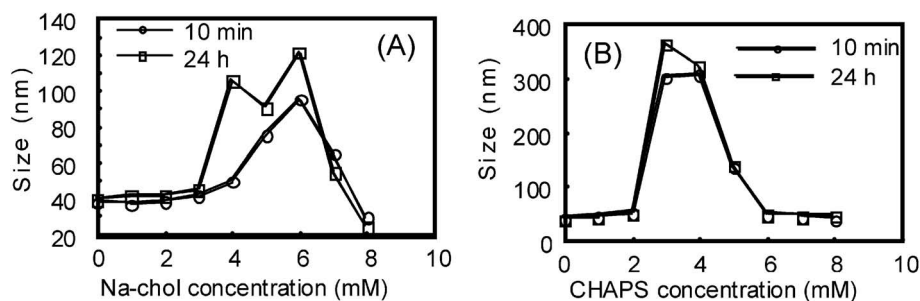


Fig. 6. Dependence of Average Particle Sizes of EPC/Na-cholesterol (A) and EPC/CHAPS (B) Aggregates on Detergent Concentrations and Elapsed Times

去すると大きなベシクルが得られた。ベシクル破壊過程で出現する4つの段階のうち、放置することのみにより、顕著なサイズの変化が起こるのは、EPC/CHAPS系のSUV*段階のみであった(Fig. 6)。

Figure 7にはEPC/Na-cholesterol/CaCl₂系の平均粒子径のNa-cholesterol濃度と時間への依存性を示す。CaCl₂が共存(Na-cholesterol濃度の40%)するとき、2-4 mMのNa-cholesterolを含むSUV*の経時的な粒子径の増加は、CaCl₂を含まない場合(Fig. 6(A))よりも顕著である。このEPC/Na-cholesterol/CaCl₂系よりNa-cholesterolを除去するとサイズの大きなりポソームが得られた。これより、Na-cholesterolが常に小さいりポソームを生成させるのは、界面活性剤除去の途中で生成するSUV*がNa-cholesterolの含有によって負電荷を帯び、粒子間の静電的反発が誘発され、粒子の融合と成長を妨げられるものと推定される。次に、CaCl₂がNa-cholesterolを含むSUV*の電荷を中和したので、粒子の融合成長が可能になったことが推定される。

Figure 8(A), (B)は、超音波法で作製したSUVに適量のNa-cholesterol(Re=0.58)を添加してSUV*を作製した直後(A)と、そのSUV*を7日放置したのち(B)の、Figure 8(C), (D)は、超音波法で作製したSUVに適量のOG(Re=1.0)を添加してSUV*を作製した直後(C)と、これを7日放置したのち(D)の凍結切断電子顕微鏡写真である。Figure 8をみると、SUV*を7日の放置することによる粒子径の増加はNa-cholesterol系では少なく、OG系では多い。また、OG系では融合の途中と予想される粒子の写真が観測される[Fig. 8(D)]。

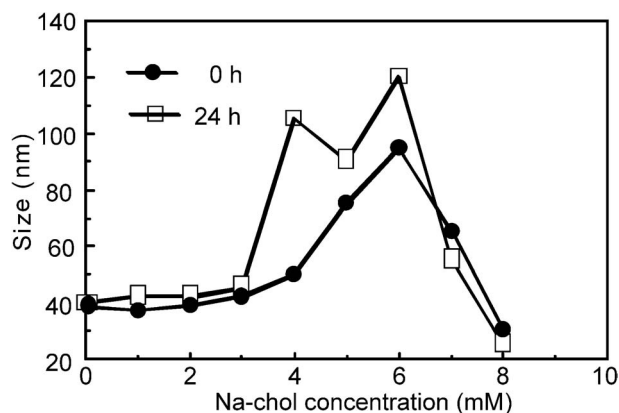


Fig. 7. Dependence of Particle Sizes of EPC/Na-cholesterol Aggregates on Na-cholesterol Concentrations and Elapsed Times in the Presence of CaCl₂ (40% of Na-cholesterol Concentration)

次に、既知量のCHAPS(ステロイド骨格を持つ両性イオンの界面活性剤)とタウロコール酸ナトリウム(TC)(ステロイド骨格を持つアニオン型界面活性剤)を含むEPCの凝集系の粒子径と濁度について考察する。Figure 9(A)にはEPC/CHAPS系、Figure 9(B)にはEPC/TC系の濁度と粒子径のReへの依存性を示す。EPC LUV/CHAPSとEPC LUV/TC系でも、Figure 9に出現している屈曲点は分配係数の屈曲点、電子顕微鏡写真で観測される形態の変化点と対応したので、CHAPS³²⁾とTC³³⁾によるベシクル破壊もFig. 4に示すのと同様に4段階で進行することが示された。CHAPSでは、SUV*の生成は $0.04 < Re < 0.21$ の範囲で起こり、混合ミセルの生成は $Re = 0.52$ で開始する。TC系では、SUV*の生成は $0.14 < Re < 0.21$ の範囲で起こり、混合ミセルの生成は $Re = 0.59$ 以上で起こる。CHAPS系の場合、濁度には $Re = 0.2$ 付近、粒子径には $Re = 0.5$ 付近に顕著な極大が出現し、SUV*領域では大きな粒子径が観測される[Fig. 9(A)]。一方、TC系の場合、濁度と粒子径の極大は顕著でなく、SUV*領域($0.14 < Re < 0.21$)でも粒子径が小さい

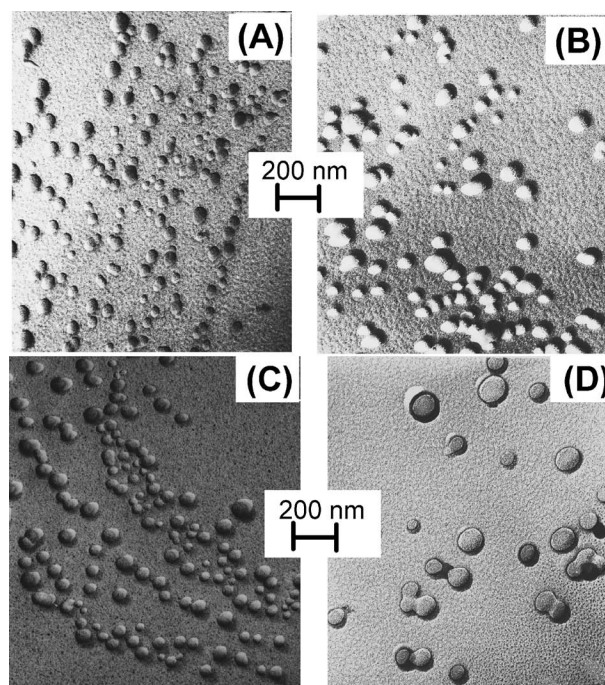


Fig. 8. Freeze-Fracture Electron Micrographs of EPC SUV* after Addition of Na-cholesterol at a Molar Ratio of 1.0 Immediately (A), and 7 Days (B) after the Addition of Na-cholesterol, and Those after Addition of OG at a Molar Ratio of 1.3 Immediately (C), and 7 Days (D) after the Addition of OG. The bars represent 200 nm

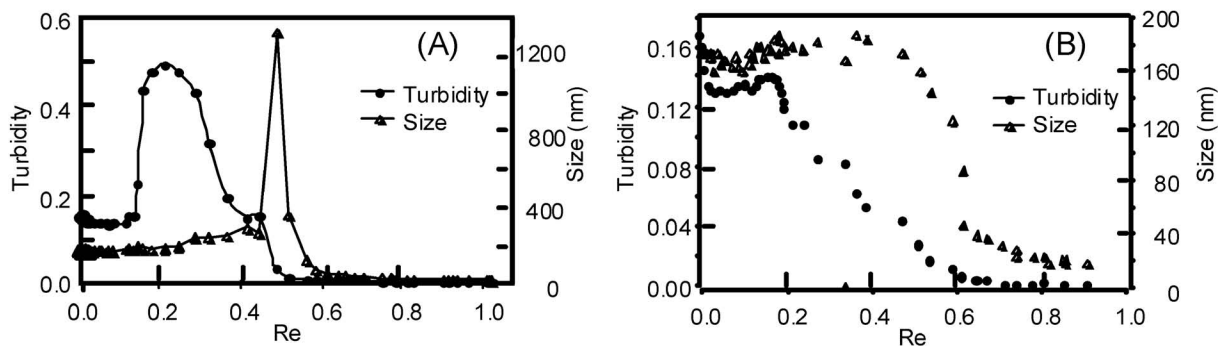


Fig. 9. Plots of Turbidities (●) and Sizes (▲) against Re for EPC/CHAPS (A) and EPC/TC (B) Mixed Aggregates

ままである [Fig. 9(B)]. 一方, 混合ミセルから CHAPS を除去すると大きな, TC を除去すると小さなリポソームが得られた. これらの結果は, 界面活性剤が正味の電荷を持つと小さな, 持たないと大きなリポソームを生成させる傾向のあることを指示する.

以上より, SUV*が界面活性剤除去法で生成するリポソームのサイズの決定段階であることが推測される. Figure 10 には混合ミセルから界面活性剤の除去によるベシクルの生成機構を模式的に示す. ベシクル生成はベシクル破壊 (Fig. 4) の逆の順序で進行する. すなわち, 混合ミセル (第1段階) より界面活性剤を除去するとまずミセルの成長, 巨大化 (中間構造体の生成) が観測される (第2段階). さらに界面活性剤を除去すると, SUV*が生成し (第3段階), さらに界面活性剤濃度が減少するとベシクルが生成する (第4段階). われわれのモデルを用いると, ベシクルサイズの成長には SUV*の時間依存的な融合, 成長が不可欠である. 例えば, OG を含む混合ミセルから素早く界面活性剤を除去する (ビーズ法など) と小さなベシクルが, 時間を掛けて除去する (透析法など) と大きなベシクルが得られる傾向のあることを説明できる. また, Na-cholesterol や TC が常に小さいベシクルを生成させる傾向があるのは, 界面活性剤の添加により SUV*が負電荷を持つことにより粒子の融合, 成長が妨げられるためと推定される. そこで, Na-cholesterol を含む SUV*の電荷を CaCl_2 で中和したのちに, Na-cholesterol を除去すると大きなベシクルの生成が可能になった. Lichtenberg らによる三段階モデル³⁰⁾と Ollivon らによるその改良モデル³¹⁾ではラメラシートが成長する際にベシクルのサイズを決定していたが, われわれ

はサイズの決定段階が SUV*であるモデルを構築し, 混合ミセルから OG と Na-cholesterol の除去によって生成するリポソームの粒子径に関する問題点を解決できた.

4. リポソームの流動性とその制御

スピンプローブ 5-, 12-, 及び 16-doxyloystearic acid (5-, 12-, 及び 16-DS) を使い分けるとリン脂質の炭化水素鎖の異なる位置をラベルでき, 異なる位置での流動性・運動性を比較できる. Viriyaraj らは, EPC/界面活性剤 (OG, CHAPS, または TC) のベシクルと EPC/界面活性剤の混合ミセルの流動性を比較して興味深い結果を得た.³²⁻³⁴⁾ Figure 11 (A) には EPC/TC, Fig. 11 (B) には EPC/OG の混合凝集系 (脂質濃度 5 mM) 中に組み込まれた 5-DS の ESR スペクトルを示す. 界面活性剤濃度が低い, ベシクル破壊の第1, 第2段階では EPC/OG 系でも EPC/TC 系でも ESR スペクトルは異方性を持つ. 界面活性剤濃度が増加し, 第4段階 (混合ミセル) に達すると, EPC/TC 系のスペクトルは異方性を持つが, EPC/OG 系のそれは次第に等方的なスペクトルに変化する [Fig. 11 (B-e)]. Figure 11 には示していないが, EPC/CHAPS 系, EPC/Na-cholesterol 系の混合ミセルでは Fig. 11 (A-e) と類似の異方性のあるスペクトルが, EPC/ C_{12}E_8 系の混合ミセルでは Fig. 11 (B-e) と類似の等方的なスペクトルが得られた. 等方的な ESR スペクトルの回転相関時間 (τ_c) を, ns を単位として Eq. (3) を用いて計算した.

$$\tau_c = 0.65 \times W_0 [(h_0/h_{-1})^{1/2} - 1] \quad (3)$$

ここで, W_0 は核スピン量子数 $I=0$ の吸収帯の極大から極小までの線幅, h_0 と h_{-1} はそれぞれ, $I=0$ と -1 の吸収帯の極大から極小までの高さであ

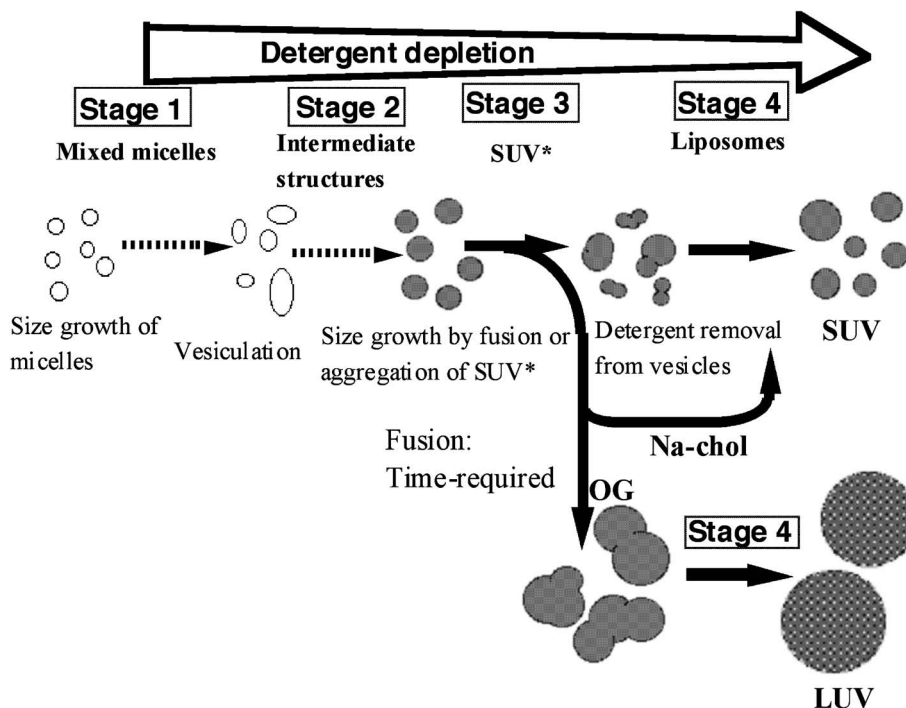


Fig. 10. Mechanism of Liposome Formation from Mixed Micelles and Size Regulation during a Period of Liposome Preparation

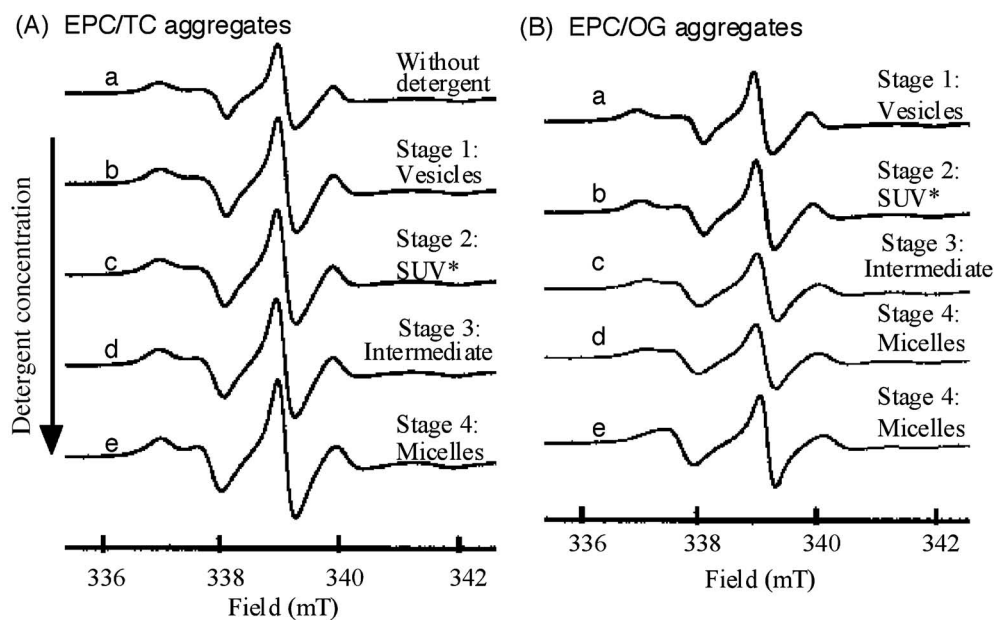


Fig. 11. ESR Spectra of 5-DS in Mixed Aggregates.

A: EPC LUV free from TC (a), EPC aggregates containing 1.5 (b), 2.75 (c), 4.75 (d), or 7.0 (e) mM TC. B: EPC aggregates containing 10 (a), 16 (b), 26 (c), 32 (d), or 36 (e) mM OG. Lipid concentration, 5 mM; temperature, 25°C

る。³⁵⁾

Freedらは、回転相関時間を異方性のあるスペクトルに拡張して次式を導出した。³⁶⁾

$$\tau_c = a \times (1 - T_z' / T_z)^b \quad (4)$$

ここで、 T_z' は実測の外側の超微細分裂幅の1/2、 T_z'

は流動性が最小の T_z' の極限值 (doxylstearic acidでは3.36 mT)である。定数a, bは採用したモデルに依存するが、ブラウン運動による拡散モデルで、 τ_c の単位がnsのとき、 $a=0.54$ と $b=-1.36$ である。

Figure 12にはEPC LUV/OG (A), EPC LUV/

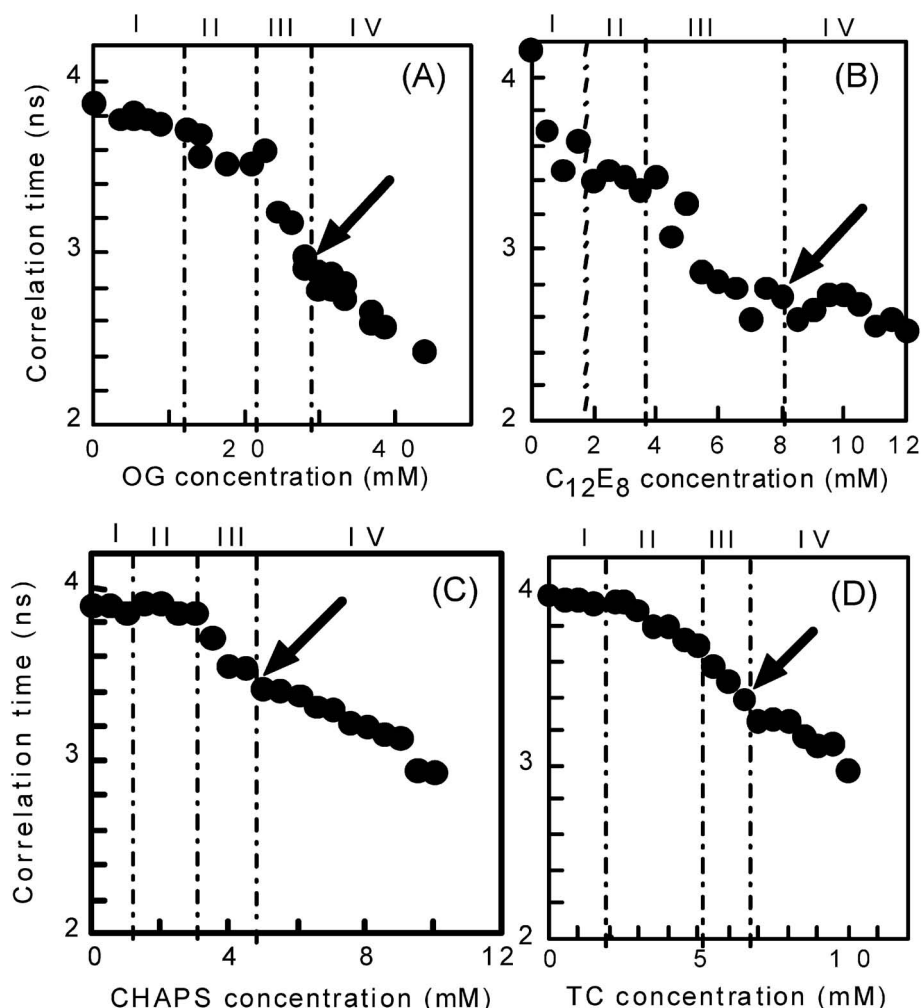


Fig. 12. Dependence of Rotational Correlation Times of 5-DS in EPC LUV/OG (A), EPC LUV/ $C_{12}E_8$ (B), EPC LUV/CHAPS (C), and EPC LUV/TC (D) Mixed Aggregates (Lipid Concentration: 5 mM) on Detergent Concentrations at 25°C

$C_{12}E_8$ (B), EPC LUV/CHAPS (C), 及び EPC LUV/TC (D) 系中の 5-DS の回転相関時間の界面活性剤濃度依存性を示す。Figure 12 中の破線はベシクル破壊の相転移点、文字 I, II, III, IV はその範囲がベシクル破壊のそれぞれ第 1, 第 2, 第 3, 第 4 段階であることを示す。Figure 12 をみると、ベシクル破壊の第 1 段階では回転相関時間は大きく、第 2 段階が終了するまで τ_c は大きな値のまま変化が少ない。これは系がまだラメラ構造を有することに対応する。しかし、 $C_{12}E_8$ を含む系では第 1, 第 2 段階でも回転相関時間の減少量がやや多い。これは、 $C_{12}E_8$ による炭化水素鎖の破壊がベシクル破壊の第 1 段階で、 $C_{12}E_8$ の添加量が少ないときから開始していることを意味する (Fig. 12B)。第 3 段階ではどの界面活性剤でも回転相関時間の減少が最も急激である。これは界面活性剤濃度の増加とともにラメ

ラ構造破壊が急速に進行することに対応する。

また、最少濃度の OG または $C_{12}E_8$ を含む混合ミセル [Fig. 12 (A), (B) 中の矢印で、それぞれ $\tau_c = 2.9$ 及び 2.7 ns] の流動性は大きく、最少濃度の CHAPS 又は TC を含む混合ミセル [Fig. 12 (C), (D) 中の矢印で、それぞれ $\tau_c = 3.4$ 及び 3.4 ns] の流動性は小さい。これより、混合ミセル中の炭化水素鎖の配列は OG 又は $C_{12}E_8$ を含む系では秩序が小さく、CHAPS または TC を含む系では秩序の大きいことが分かる。混合ミセルの回転相関時間の減少は CHAPS と TC 系では最も顕著で、OG 系でも減少が観測される。一方、 $C_{12}E_8$ を含む系では混合ミセル生成開始点で回転相関時間が既に十分小さく、さらに $C_{12}E_8$ 濃度が増加しても τ_c の減少はほとんど観測されない。このように、最少濃度の $C_{12}E_8$ を含む混合ミセルでも炭化水素鎖の流動性は十分に大

きい。このように、ミセル-ベシクル転移機構は界面活性剤の種類によらないで共通であるが、転移の途中に出現する構造体の物性（流動性、炭化水素鎖の配列の規則性）は界面活性剤の種類による差異が顕著であることが分かる。

EPC/界面活性剤系中の 16-DS の ESR スペクトルはベシクル破壊の全過程において等方的であった。Figure 13 には EPC/OG (A), EPC/CHAPS (B), EPC/TC (C), 及び EPC/Na-cholesterol (D) 凝集系（脂質濃度：5 mM）中の 16-DS の回転相関時間の界面活性剤濃度依存性を示す。16-DS では EPC の炭化水素鎖の末端部の流動性を観測している。16-DS の回転相関時間も相転移点付近で屈曲している。一方、界面活性剤濃度が増加すると、EPC/OG 系の回転相関時間は減少し、EPC/CHAPS, EPC/TC, EPC/Na-cholesterol 系のそれは増加している。Figure 13

には示していないが、EPC/C₁₂E₈ 系の回転相関時間は、OG 系と同様に、C₁₂E₈ 濃度が増加するほど減少した。以上より、EPC リポソームにステロイド骨格を持つ界面活性剤を添加するとリン脂質の炭化水素の末端部の流動性を減少させ、炭化水素鎖の配列の秩序が増加する。逆に、ステロイド骨格を持たない界面活性剤を添加すると炭化水素鎖の末端部の流動性が増加する。

Figure 14 (A) には EPC SUV/Na-cholesterol, DMPC SUV/Na-cholesterol 系中の 12-DS の回転相関時間の Re への依存性、Fig. 14 (B) には EPC SUV/cholesterol, 及び DMPC SUV/cholesterol 系中の 12-DS の回転相関時間の cholesterol mol% への依存性を示す。³³⁾ 12-DS の回転相関時間は Na-cholesterol の Re とともに増加する。Na-cholesterol 系の屈曲点の Re はベシクル破壊の相転移点と対応する。cholesterol はベシクルを破

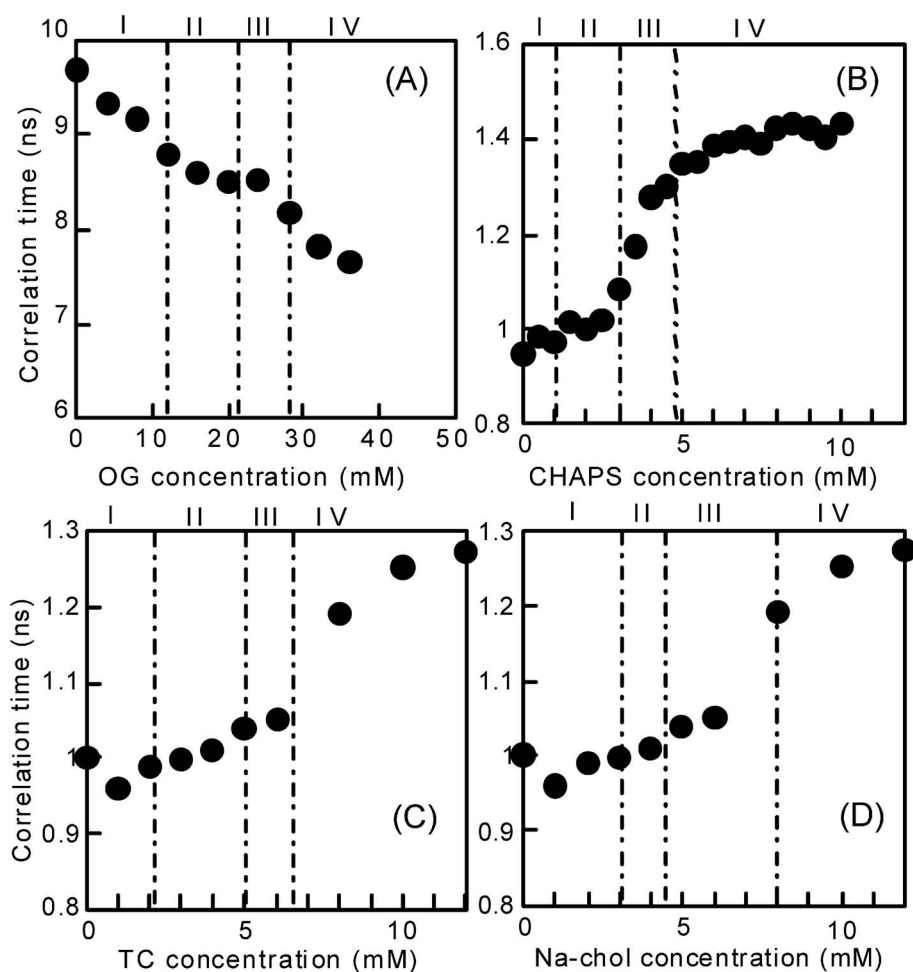


Fig. 13. Variation in Rotational Correlation Times of 16-DS in EPC LUV/OG (A), EPC LUV/CHAPS (B), EPC LUV/TC (C), and EPC LUV/Na-cholesterol (D) Mixed Aggregates (lipid concentration: 5 mM) with Detergent Concentrations at 25°C

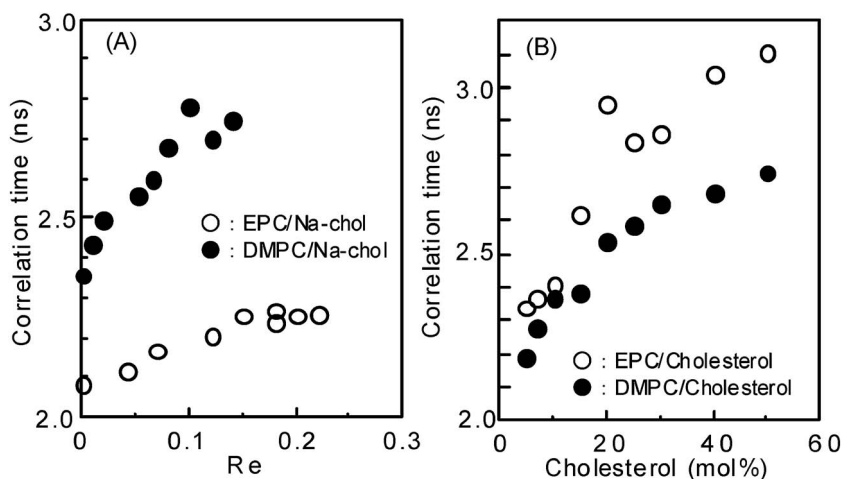


Fig. 14. Changes in Rotational Correlation Times of 12-DS in EPC SUV/Na-chol (○) and in DMPC SUV/Na-chol (●) Aggregates with Re (A), and Those in EPC SUV (○) and in DMPC SUV (●) with Cholesterol mol% (B) at 25°C.

壊しない化合物であるが、回転相関時間は cholesterol mol%とともに増加する。Cholesterol 系では増加は単調で、屈曲点を持たない。このことから、12-DS の回転相関時間が Na-chol や cholesterol 濃度とともに増加するのはステロイド骨格の有無によるもので、ベシクルが破壊されるかどうかとは直接関係がないと推定される。

Figure 12-14 をみると分かるように、5-DS (炭化水素鎖の極性部近くのプローブ)、12-DS (炭化水素鎖の中央部付近のプローブ)、16-DS (炭化水素鎖の末端部付近のプローブ) の回転相関時間は大きさの順に、 $5\text{-DS} > 12\text{-DS} > 16\text{-DS}$ となっている。一方、流動性は逆の順序で、炭化水素鎖の末端部ほど大きい。いずれの場合でも3つの相転移点付近に回転相関時間の屈曲点が見い出されることは、ベシクル破壊機構(相転移点の出現)は用いた界面活性剤の種類によらないで共通であることを支持する。また、相転移に伴い、凝集系の炭化水素鎖全体に物性の不連続的な変化が及ぶことが分かる。EPC/TC ミセル中の5-DSの回転相関時間が大きいこと、及び16-DSの回転相関時間がCHAPS濃度の増加とともに増加すること、12-DSの回転相関時間がCholesterol濃度の増加とともに増加することより、EPC/TC、EPC/CHAPS、EPC/Na-chol ミセルの炭化水素鎖の配列がEPC/OG、EPC/C₁₂E₈ ミセルの配列よりも秩序正しい。また、TC、CHAPS、Na-chol を含むミセルの炭化水素部の流動性が小さいのはステロイド骨格の持つ膜の凝集効果のためと

推定される。

5. おわりに

本研究により、ミセル-ベシクル転移機構は3つの相転移点を持ち、次のように4段階で進行することが明らかになった。

ベシクル ⇌ SUV* ⇌ 中間構造体 ⇌ 混合ミセル

ミセル-ベシクル転移のモデルは界面活性剤の種類に依存しないで、共通であった。混合ミセルから界面活性剤の除去によるベシクルの生成はベシクル破壊の逆の順序で進行した。4段階のうち、時間依存的なSUV*の融合、成長が調製時におけるベシクルサイズの決定段階であった。このモデルを用いることにより、混合ミセルよりOGを素早く除去すると小さなベシクルが、ゆっくりと除去すると大きなベシクルが得られること、Na-cholを用いると常に小さいベシクルが得られる傾向のあることを説明できた。

界面活性剤除去法で生成するリポソームのサイズには、界面活性剤分子の持つ正味の電荷が重要であった。すなわち、正味の電荷を持たないOGとCHAPSなどはサイズの大きなりポソームを、アニオン型界面活性剤であるNa-cholとTCは小さなりポソームを生成させる傾向が認識された。

5-DSと16-DSの回転相関時間は、OG又はC₁₂E₈を含む凝集系では小さく(流動性は大きい)、CHAPS、TC、又はNa-cholを含む凝集系では大きかった(流動性は小さい)。特に、16-DSの回転相関時間はステロイド骨格を持つ界面活性剤の濃度と

ともに増加し、ステロイド骨格を持たない界面活性剤の濃度とともに減少した。これより、EPC/界面活性剤系中のリン脂質の炭化水素鎖の配列の秩序は、少量のOG又はC₁₂E₈を含む混合ミセルでは小さく、少量のCHAPS, TC, 又はNa-cholを含む混合ミセルでは大きいことが推定された。そして、混合ミセルの段階での炭化水素鎖の配列の秩序の違いが界面活性剤除去法により調製されるリポソームの物性やリポソーム中に再構成されたタンパク質の配向性に影響することが予想される。

REFERENCES

- Mimms L. T., Zampighi G., Nozaki Y., Tanford C., Reynolds J. A., *Biochemistry*, **20**, 833–840 (1981).
- Martin D. W., Ueno M., *Biophys. J.*, **47**, 154 (1985).
- Levy D., Gulic A., Seigneuret M., Rigaud J. L., *Biochemistry*, **29**, 9480–9488 (1990).
- Seras M., Ollivon M., Edwards K., Lesieur S., *Chem. Phys. Lipids*, **66**, 93–109 (1993).
- Dolder M., Engel A., Zulauf M., *FEBS Lett.*, **382**, 203–208 (1996).
- Paternostre M., Viard M., Meyer O., Ghanam M., Ollivon M., Lesieur S., *Biophys. J.*, **72**, 1683–1694 (1997).
- Kragh-Hansen U., Le Maire M., Moller J. V., *Biophys. J.*, **75**, 2932–2946 (1998).
- Rigaud J. L., Pitard B., Levy D., *Biochim. Biophys. Acta*, **1231**, 223–246 (1995).
- Senior J., Gregoriadis G., *Life Sci.*, **30**, 2123–2136 (1982).
- Senior J., Grawley J. C., Gregoriadis G., *Biochim. Biophys. Acta*, **839**, 1–8 (1985).
- Senior J., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **3**, 129–193 (1987).
- Sato Y., Kiwada H., Kato Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 4244–4252 (1986).
- Ueno M., *Membrane*, **18**, 96–106 (1993).
- Ueno M., Kashiwagi H., *J. Oil Chem. Soc.*, **49**, 1131–1139 (2000).
- Ueno M., Kashiwagi H., Hirota N., Sun C., *Stud. Surf. Sci. Catal.*, **132**, 501–504 (2001).
- Ueno M., Tanford C., Reynolds J. A., *Biochemistry*, **23**, 3070–3076 (1984).
- Almog S., Lichtenberg D., *Biochemistry*, **27**, 873–880 (1988).
- Lasic D. D., Martin F. J., *J. Colloid Sci.*, **133**, 539–544 (1989).
- Rotenberg M., Lichtenberg D., *J. Colloid Sci.*, **144**, 591–594 (1991).
- Walter A., Vinson P. K., Kaplun A., Talmon Y., *Biophys. J.*, **60**, 1315–1325 (1991).
- Spink C., Lieto V., Mereand E., Edward K., *Biochemistry*, **30**, 5104–5112 (1991).
- Egelhaaf S. U., Schrtzenberger P., *J. Phys. Chem.*, **98**, 8560–8573 (1994).
- Silvander M., Karlsson G., Edwards K., *J. Colloid Sci.*, **179**, 104–113 (1996).
- Ueno M., *Biochim. Biophys. Acta*, **904**, 140–144 (1987).
- Ueno M., *Biochemistry*, **28**, 5631–5634 (1989).
- Ueno M., Kashiwagi H., Hirota N., *Chem. Lett.*, 217–218 (1997).
- Kashiwagi H., Sagasaki S., Tanaka M., Aizawa K., Sun C., Ueno M., *Stud. Surf. Sci. Catal.*, **132**, 603–606 (2001).
- Sun C., Kashiwagi H., Ueno M., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 1145–1150 (2002).
- Ueno M., Hirota N., Kashiwagi H., Sagasaki S., *Colloid Polym. Sci.*, **282**, 69–75 (2003).
- Lichtenberg D., Robson R. J., Dennis E. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **737**, 285–304 (1983).
- Ollivon M., Eidelman O., Blumenthal R., Walter A., *Biochemistry*, **27**, 1695–1703 (1988).
- Viriyaraj A., Kashiwagi H., Ueno M., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 1140–1146 (2005).
- Viriyaraj A., Kashiwagi H., Ueno M., *Colloid Polym. Sci.*, **284**, 1131–1138 (2006).
- Viriyaraj A., Kashiwagi H., Ueno M., *Chem. Lett.*, **2005**, 1400–1401.
- Cannon B., Polnaszek C. F., Butler K. W., Erikson L. E. G., Smith I. C. P., *Arch. Biochem. Biophys.*, **167**, 505–518 (1975).
- Goldman S. A., Bruno G. V., Freed J. H., *J. Phys. Chem.*, **76**, 1858–1860 (1972).