

リポソーム aggregation-disaggregation 前転移温度の
カルシウムイオン濃度依存曲線を説明する理論モデル系の構築

荻原利彦 (麻布大学) 永井喜則 (国士舘大学)

はじめに

近年細胞融合の技術が確立され¹⁾、その技術は、生物、医学、薬学など多くの生物科学の分野で活用されている。その手法としては、電気パルスを用いる電気的方法やセンダイウイルスを用いる生物的な方法などもあるが、Polyethylene Glycol (PEG)を用いる化学的手法が最も広く用いられている。融合剤としてPEGを使用することの化学的方法においては、融合能を上げる目的で、しばしば融合促進剤を用いることがある。融合促進剤として、Dimethyl Sulfoxide (DMSO) や Poly-L-arginine, Poly-L-lysine, Ca²⁺などが報告されている^{1,2)}。我々は、細胞融合やその前段階としての細胞凝集の機序に興味を持ち、人工細胞膜モデルであるリポソームに対し、PEGなどの融合剤を投与し、その凝集や融合状態を調べてきた³⁾。凝集および融合の研究に当たっては、凝集と融合を明確に区別することが重要であることから、リポソームが可逆的に凝集・分散を行う現象を凝集反応 (aggregation-disaggregation)、不可逆的に反応する場合を融合 (fusion) と定義した。

融合促進剤として用いられているCa²⁺のリン脂質膜に対する効果を調べるために、表面電荷がほぼ中性の DPPC と負である DPPE の二種類のリン脂質のリポソームを作製して、Ca²⁺の凝集や融合に及ぼす影響を調べた結果、凝集や融合の転移温度が Ca²⁺の濃度に依存して変化し、特に、DPPC では aggregation-disaggregation-aggregation というリポソームの構造転移を起こすことが解かった。

本報告では、実験的に得られた、リポソームの起こす aggregation-disaggregation 構造変化の転移温度の Ca²⁺ 濃度依存性を説明するための統計熱力学的理論の枠組みについてどのような取り扱いが可能かを検討する。

I リポソーム aggregation-disaggregation 構造転移に関する実験

材料および方法

1. 試料の調整

リポソームを作製するに当たっては、Sigma製の dipalmitoil-L- α -phosphatidylcholine (DPPC) と dipalmitoil-L- α -phosphatidylethanolamine (DPPE) の二種類の合成リン脂質を用いた。CaCl₂はwakoの特級を用いた。

DPPCまたはDPPEの濃度が10mg/mlになるように超純水を加えて、試験管内に分散液を調整した。DPPC分散液は50℃で、DPPE分散液は75℃で15分間温浴させ、その温度を保ちながら1分間超音波処理を行い多重層リポソームを作製した。その後、室温に戻してからこの多重層リポソームの直径を顕微鏡で測定したところ、大きなものは1~3 μ m、多くのものがサブミクロンのオーダーであった。

塩化カルシウム溶液の濃度は、超純水を用いて最終濃度の2倍濃度に調整した。リポソーム-Ca²⁺分散液は、リポソーム分散液と同量の塩化カルシウム溶液を加え、脂質濃度が5mg/mlとなるように調整した。

2. 装置

混合してから15分間静置した後、この分散液を、ホールスライドグラスに数滴たらしカバーグラスをかぶせ、顕微鏡観察用温度制御装置⁴⁾で温度を制御しながら、光学顕微鏡 (オリンパス BH-2) で観察した。温度は0.1℃/minの速さで昇温、降温を行い、その温度範囲は20℃から主転移温度(T_c)⁵⁻⁸⁾より10℃程高い温度まで、具体的にはDPPCリポソームでは20℃~50℃、DPPEリポソームでは20℃~75℃の範囲であった。

Ca²⁺イオンを取り除くときは、分散液を遠心し (KOKUSAN H-100BC; 3000rpm, 10分) その上澄みを取りさり同量の水を加えた。

直接の検鏡による観察と同時に、この映像データを、顕微鏡用ビデオカメラ (浜松フォトニクス C-2400) で映像信号に変換し、その信号に温度情報をスーパーインポーズさせたものを、テレビ画面で確認しながらビデオテープに記録した。

結果

1. DPPCリポソーム-Ca²⁺分散液

40mM以下の濃度のCa²⁺では、DPPCリポソーム分散液は、前転移温度 (Tp、約 34℃, 3, 5) 以下で凝集によるコロニー形成が観察されたが、その試料を昇温するとTpで分散状態になり、その状態は主転移温度 (Tc、42℃, 3, 5-7) 以上でも同じであった。次に同試料を降温するとTp以下で再凝集を起こした。この現象は可逆的であり、同じ試料で数回昇降温を繰り返しても観察された。

Ca²⁺濃度が50mMから350mMの範囲では、Tp以下で凝集していたリポソームが、昇温により一度分散状態になり、さらに昇温を続けると再度凝集をおこすという現象が観察された。この現象も可逆的であり、同じ試料の温度の昇降温を繰り返す度に、この現象が観察された。再凝集を引き起こす温度は、Ca²⁺濃度が100mMまでは急激に上昇し、100mM以上では44℃付近であった。

Ca²⁺濃度が350mMを越えると、凝集していたリポソーム (Fig.1(a)) は昇温により揺動と融合を起こし (Fig.1(b))、 斬過に伴いさらに融合が進み、やがてミエリ形が観察された (Fig.1(c))。このミエリン形は温度をTp以下に下げても観察された。この試料を昇温する前に、Ca²⁺を取り除き、その濃度を350mM以下にすると、350mM以下のその濃度で観察された反応が見られた。

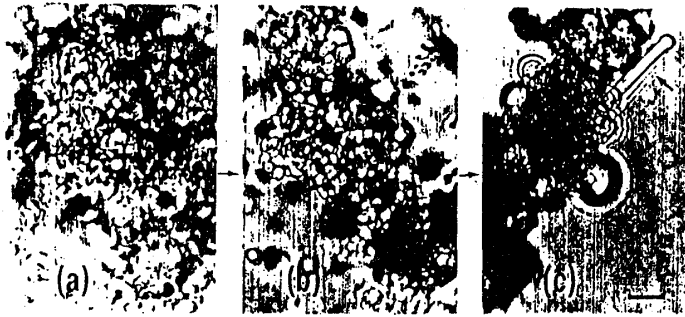


Fig.1 Light micrographs of DPPC liposome at concentration of 5mg/ml with 600mM Ca²⁺.

(a) colonies of DPPC liposomes by aggregation at 20 C, (b) fusion of DPPC liposomes at 42.5 C and (c) myelin figures by the fusion at 50 C (arrow: the position of myelin figure, bar: 10 m).

融合を引き起こす温度は600mMまでは44℃ではほぼ一定であるが、600mM以上の濃度では温度の上昇がみられた。分散液の温度の昇降温によって観察されたこれらのCa²⁺濃度の変化に伴うDPPCリポソームの状態変化の相図をFig.2に示した。

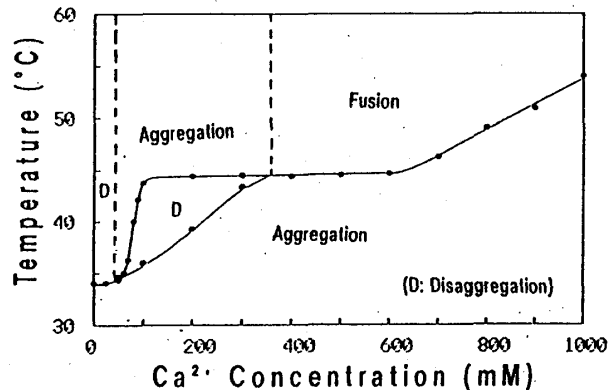


Fig.2 The state of DPPC liposomes (5mg/ml) and the temperature which aggregation, disaggregation and fusion were observed upon heating with changing Ca²⁺ concentration.

2. DPPEリポソーム-Ca²⁺分散液

DPPCリポソームと異なり、Tpが0℃⁸⁾であるDPPEのリポソームは室温でも、Tc (63℃) ^{7, 8)}以上の75℃に昇温しても分散状態であった。また、この分散液にCa²⁺を

加え濃度を0.1~0.6mMにしても同様の現象が観察された。

DPPE分散液に、0.7mM以上のCa²⁺を加えると、DPPEリポソームは室温で凝集しコロニーを形成した。DPPC-Ca²⁺分散液でのCa²⁺が350mM以上の場合と同じように (Fig.1)、この試料の温度を昇温すると、T_c付近でコロニーの揺動が起こり融合が観察された。さらに、T_c以上に温度を保つと、融合が進みミエリン形が観察された。DPPC分散液と同様に、DPPE-Ca²⁺分散液を昇温する前に、Ca²⁺を取り除き、その濃度を0.6mM以下にして昇温すると、融合は観察されなかった。

0.7mM以上のCa²⁺存在下で、リポソームが融合をおこす温度は、Ca²⁺濃度を増すに従い徐々に高くなっていった。DPPEリポソームが昇温により揺動と融合を起こす温度と、Ca²⁺濃度との関係の相図をFig.3に示した。

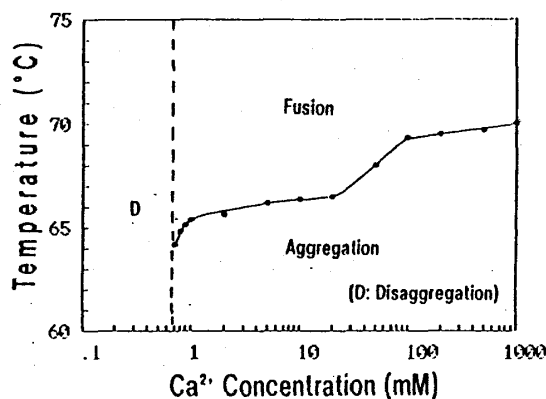


Fig.3 The states of DPPE liposomes (5mg/ml) and the temperature which aggregation, disaggregation and fusion were observed upon heating with changing Ca²⁺ concentrations.

3. 補足

我々は、リポソーム-NaCl系の試料を用い、NaCl濃度を100mMから2Mまで100mM間隔で変えて、Cl⁻の影響を調べた結果、NaClは凝集や融合に影響を与えなかった。これより、本報で得られた結果はCa²⁺による影響であると結論した。

Ca²⁺を含まない5mg/mlの濃度のDPPCリポソームでは、T_p以下で凝集しT_p以上で分散するという可逆的凝集反応が確認されている(3,9)。Ca²⁺濃度が40mMまでは同様の可逆的凝集反応が観察されたので、イオンの影響は受けないが、50mM以上ではその影響を受ける。

50~350mMの濃度範囲では昇温にともない凝集-分散-凝集という、40mM以下のときは異なる可逆的凝集反応が観察された。Ca²⁺濃度が100~350mMにおいては、昇温にともなう凝集-分散-再凝集現象の、凝集-分散が観察される温度は34℃から44℃まで上昇し、濃度が350mMより高くなるとその現象は見られなくなった。DPPCではCa²⁺濃度が高くなるとT_pがなくなるとの報告がある(10)。本実験での凝集-分散温度の上昇とそれに伴うこの現象の消失も、T_pの消失によるものと思われる。

II 理論モデル系構築の立場

DPPC が示す、aggrigation-disaggrigation-aggrigation 構造転移温度の Ca²⁺ 依存性を説明するための理論を、我々は未だ完成していない。この現象を説明する理論の枠組みとして、分配関数を用いる統計熱力学の応用を考えている。この報告書では、我々の考えている筋書きの概略を紹介する。

この系はリポソーム、水、カルシウムから成っている。全系のハミルトニアンを次のように書くことにする。

$$\begin{aligned}
 H &= H_l + H_w + H_{Ca} + \sum_{\langle i, \alpha \rangle} \phi^l (|r_i - X_{\alpha}|) \\
 &+ \sum_{\langle i, \beta \rangle} \phi_a (|r_i - Z_{\beta}|) + \sum_{\langle \alpha, \beta \rangle} \phi^{Ca} (|X_{\alpha} - Z_{\beta}|) \\
 H_l &= T_l + \sum_{\langle i, j \rangle} \tilde{\phi}^l (|r_i - r_j|) \quad , \quad H_w = T_w + \sum_{\langle \alpha, \alpha' \rangle} \phi^w (|X_{\alpha} - X_{\alpha'}|) \\
 H_{Ca} &= T_{Ca} + \sum_{\langle \beta, \beta' \rangle} \phi^{Ca} (|Z_{\beta} - Z_{\beta'}|) \quad T_l = \sum \frac{p_c^2}{2m_c} \quad , \quad T_w = \sum \frac{p_w^2}{2m_w} \quad , \quad T_{Ca} = \sum \frac{p_{Ca}^2}{2m_{Ca}}
 \end{aligned}$$

ここには、異なる3成分間に働く相互作用と、同一成分間に働く相互作用の合計6つの相互作用項が現われてくる。状態方程式は、通常、次のように導かれる。

$$P = - \left(\frac{\partial F}{\partial V} \right)_T, \quad F = k_B T \ln Z$$

ただし、 P は圧力、 V は体積、 F は自由エネルギー、 Z は分配関数、 T は温度、そして、 k_B はボルツマン定数である。

これから解かるように、状態方程式を導くのに運動エネルギー項は関与しない。関与するのは相互作用エネルギーの項だけであり、このとき、分子内部のエネルギーは、それが空間体積に直接の効果をもたないので、寄与しない。従って、相互作用エネルギー項の全位相空間に関する積分の評価方法だけを考えればよいことになる。

相互作用項の位相空間積分は、一成分系の場合、粒子の分布密度を導入して、評価すると、van der Waals 状態方程式が導かれる (11)。この方法は簡便で有効と思われるので、リポソーム分散溶液系にも適用できるであろう。ただ、多成分系の取り扱い上、体積評価をどのようにするかが教科書的問題でなくなる。この点の解決が必要である。全系の状態は水溶液なので、全系の状態方程式は単純な van der Waals 方程式になるであろう。多成分系の状態方程式としては、部分系の状態を決定する方程式が必要であり、全系の取り扱いの中で、不定になっていると思われる。このような問題点を解決してゆくことにより、目的のリポソームの構造転移温度の Ca^{2+} 依存性を説明する理論的モデル系に到達できると考えている。

文献

- 1)モノクロナル抗体. 東京:株式会社R & Dプランニング, 1982:13-77.
- 2)前田 由紀, 笹川 滋, 徳永 栄一. PEG による細胞融合法— ポリ-L-リジンの融合促進効果. 血液事業 1983; 6:39-45.
- 3)Ogihara T, Takamoto Y, Kumazawa H, Hayashi H. The reversible aggregation-disaggregation and fusion of phosphatidylcholine liposomes with and without polyethylene glycol. Jpn J Electrophoresis 1996;40:(in press)
- 4)高本雄治, 萩原利彦, 成田 博. 細胞及び生体成分観察用温度制御装置. 日本特許庁 公開特許公報 (A) 1995; 特許平7-274938.
- 5)Hinz HJ, Sturtevant JM. Calorimetric studies of dilute aqueous suspensions of bilayers formed from synthetic L- α -lecithins. J Biol Chem 1972; 247: 6071-6075
- 6)Chong CS, Colbow K. Light scattering and turbidity measurements on lipid vesicles. Biochim Biophys Acta 1976;436:260-282.
- 7)美島 清, 佐藤 幸一. 合成リン脂質—コレステロール—水系におけるミエリン形の形成、膜 1977; 2:387-394.
- 8)Harlos K. Pretransition in the hydrocarbon chains of phosphatidylethanolamines. Biochim Biophys Acta 1978;511:348-355.
- 9)萩原利彦. レシチンリポソームの可逆的凝集反応における温度効果、埼玉医大雑誌 1988; 15:211-219.
- 10)Graddick WF, Stamatoff JB, Eisenberger P, Berreman DW, Spielberge N. Order-disorder and the pretransition in dipalmitoyl phosphatidylcholine multilayer. Biochem Biophys Res Commun 1979; 88:907-912
- 11)森和英, 永井喜則. 準備中.