

氏 名	さい とう ひろ ゆき 齋 藤 博 幸
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 385 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 製 薬 化 学 専 攻
学位論文題目	Studies on Structure and Dynamics of Surface Monolayers of Lipid Emulsions and Binding of Plasma Apolipoproteins (脂質エマルションの表面膜構造と血漿アポリポ蛋白質の結合性に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 宮 嶋 孝 一 郎 教 授 多 賀 徹 教 授 川 寄 敏 祐

論 文 内 容 の 要 旨

生体内での脂質転送機構を担っている血漿リポ蛋白質は、非極性脂質であるトリグリセライド (TG) とコレステリルエステルのコアをリン脂質とコレステロールの混合単分子膜が被ったエマルション構造をもち、その各脂質間及び脂質と血漿中から結合したアポリポ蛋白質間の相互作用がリポ蛋白質の機能や代謝において重要な役割を果たすと考えられている。筆者は、リポ蛋白質粒子とアポリポ蛋白質との相互作用を決定する因子として、その代謝過程での表面膜やコアの脂質組成変化に着目した。本研究ではリポ蛋白質モデルとして脂質組成の異なるエマルションを用い、その表面膜とコアの物理化学的性質およびアポリポ蛋白質の結合性を評価し、両者の関連について考察した。

第 I 章 TG/水界面での脂質分子間の相互作用

エマルション表面膜の脂質分子間の相互作用を解明する目的で、各種リン脂質存在下での TG/水界面張力を測定した。これから、熱力学的手法を用いて、TG/水界面での脂質膜相成、脂質間相互作用パラメータおよび TG-リン脂質混合系の相図を求めた。その結果、リポ蛋白質中のリン脂質の主成分であるホスファチジルコリン (PC) のみが TG/水界面での PC 分子間の強い凝縮力のために安定な界面膜を形成するこのが示された。さらに、TG-PC 系の相図から、エマルション表面膜は TG と PC から成る共融混合単分子膜であり、コアを形成する過剰の TG および二分子膜を形成する過剰の PC と平衡関係にあることが示された。これはエマルション形成過程で二分子膜 (リボソーム) が共存することを熱力学的に説明するものであり、血漿中でカイロミクロンや VLDL が代謝されて生じる過剰のリン脂質が二分子膜を形成して HDL へと異化されていく過程とも関連している。

また PC とコレステロール共存下での TG/水界面張力の測定結果から、PC 表面単分子膜と TG 間でのコレステロールの吸着等温線を求めた。これから、エマルションではコレステロールの表面膜への分配はコアに比べて約20倍高いことが示された。

第Ⅱ章 エマルション表面膜およびコアの構造と運動性

エマルション表面膜は二分子膜と類似の構造をしているが、その詳細な研究はあまりなされていない。そこで筆者は、エマルション表面膜およびコアの構造や運動性について、蛍光プローブによる物理化学的な評価をおこなった。脂質エマルションはTGとPCを乳化後、超遠心分離により共存する二分子膜を分離して調製した。エマルションのコアを疎水性蛍光プローブで、また表面膜をその誘導体であるカチオン性蛍光プローブや蛍光プローブ化リン脂質で標識して、蛍光寿命や蛍光異方性を測定した。その結果、エマルション表面膜は二分子膜よりも凝縮した状態にあることが明らかとなった。さらに、時間分解蛍光異方性の解析から、エマルション表面膜中のリン脂質分子は二分子膜中に比べてアシル鎖がより配向した状態にあることが示され、これはコアの非極性脂質分子との相互作用のためであると考えられた。

つぎに、コレステロール、コレステリルオレエート(CO)を含有するエマルションの表面膜およびコアの状態変化についても評価した。その結果、二分子膜中のコレステロールはリン脂質アシル鎖の配向性や運動性を変化させるが、エマルション表面膜では、コアの脂質組成によってコレステロールの影響が異なることを見いだした。エマルションのコアの状態は、TGが液体状態であるのに対しCOは流動性の低い液晶状態であるが、コレステロールが存在しないと、コアのTGからCOへの組成変化による流動性の低下は表面膜の構造や運動性にあまり影響しない。しかし膜中にコレステロールが存在すると、このコアの組成変化は表面状態の顕著な変化を引き起こし、コレステロールの蛍光アナログを用いた蛍光消光の挙動がコアの組成によって異なる結果と併せて、TGからCOへの組成変化が表面膜中のコレステロールの存在状態を変化させていることが示唆された。すなわち、コアの組成変化は、コア自身の流動性の変化によってではなく、むしろコレステロールの表面膜中での再配置を通して表面脂質膜の構造や運動性に影響を与えていると考えられた。

第Ⅲ章 エマルション表面膜に対するアポリポ蛋白質の結合性

第Ⅰ章で述べた界面化学的手法を応用して、TG/水界面におけるブタ血漿から単離したアポリポ蛋白質A-IとPCあるいはコレステロールとの相互作用について検討した。その結果、界面単分子膜においてアポリポ蛋白質A-IはコレステロールよりもPCとの親和性が高いことが示された。これは、ブタアポリポ蛋白質A-Iのエマルションへの結合性が表面コレステロール量の増加によって低下する結果と併せて、カイロミクロン代謝過程でのアポリポ蛋白質A-Iの結合性の変化を説明するものである。さらにヒト血漿中のアポリポ蛋白質のエマルションへの結合性についても検討し、(1)表面コレステロールの増加によってアポリポ蛋白質C-IIの結合は著しく減少するが、アポリポ蛋白質Eの結合性はあまり変化しない。(2)これに対しコレステロールを含有しないエマルションのコアをTGからCOへ変化させると、アポリポ蛋白質Eの結合は半分以下に減少するがアポリポ蛋白質A-IやC-IIの結合性の変化は小さいことが示された。これらエマルションの組成変化に対するアポリポ蛋白質の結合の応答性の違いは、リポ蛋白質の脂質組成と結合アポリポ蛋白質との関係とよく一致する。

血漿中のVLDLからLDLへの代謝過程に相当する脂質組成変化、すなわちコレステロール存在下でのコアのTGからCOへの組成変化は、第Ⅱ章で示したようにコアの流動性だけでなく表面膜の状態も大きく変化させる。このとき、アポリポ蛋白質C-II、Eの結合性はともに減少し、なかでもアポリポ蛋

白質 E は全く結合しなくなった。この結果は、リポ蛋白質代謝過程での脂質組成変化が表面膜やコアの状態変化を通してアポリポ蛋白質の親和性を制御していることを示唆した。

以上、エマルション表面膜の構造を界面化学的および蛍光分光学的手法を用いて評価し、さらに、脂質組成の変化によって引き起こされる表面膜とコアの状態変化およびアポリポ蛋白質の結合性の変化について検討した。これらの結果は、リポ蛋白質の代謝過程でのアポリポ蛋白質の親和性の変化のメカニズムについて新たな知見を示すだけでなく、ドラッグデリバリー素材としての脂質エマルションの体内動態制御への有用な情報となると思われる。

論文審査の結果の要旨

血漿リポタン白質は生体での脂質の代謝・輸送の主役である。血漿リポタン白質は中性脂質のコアをリン脂質とコレステロールよりなる単分子膜で覆ったエマルション表面にアポタン白質が結合した構造をとっており、種々のアポタン白質と脂質エマルションとの相互作用（結合性）が代謝や脂質の輸送に重要な役割を担っている。本研究は脂質エマルションの組成をかせ、その表面単分子膜の性質の変化とアポタン白質の結合性との関係を物理化学的手法で研究し、その関連性を明らかにしたものである。

まず水-トリグリセライド (TG) 界面での界面張力を測定し、界面の熱力学を用いて解析した。その結果水-TG 界面でレシチン (PC) のみが安定な PC-TG 共融単分子膜を作り、この単分子膜は二分子膜 (リソソーム) と平衡関係にあることを示し、血漿中でカイロミクロンや VLDL が代謝されて生じる過剰のリン脂質が二分子膜を形成し、異化されていく過程と深く関連していることを示した。ついでエマルション表面の単分子膜とコアの構造との関係を二分子膜と比較しつつ、蛍光プローブを用いる分光学的方法で評価した。その結果エマルション表面単分子膜は二分子膜より凝縮した状態にあり、表面膜中のアシル鎖は二分子膜中より配向した状態にあることを明らかにした。この原因を明らかにするために、表面膜を構成する脂質分子とコアを形成する TG やコレステロールオレエート (CO) との相互作用を研究した。コレステロールが存在しない時は TG (液相)、CO (液晶相) いずれの場合も表面膜の構造や運動性にあまり大きな影響を与えないが、膜中にコレステロールが存在すると、表面膜状態の変化は大きく、この原因はコア自身の流動性の変化によってではなく、コア分子との相互作用（水素結合）により、コレステロールの表面膜中での再配置を通して、その構造や運動性が変化することを明らかにした。

つづいてアポリポタン白質のうち、A-I、C-II および E と脂質エマルションとの結合性を、表面膜の組成を変化させて検討した。その結果、A-I は PC 膜に親和性が高く、コレステロール量の増加に伴い結合性が低下することが明らかになり、カイロミクロンの代謝過程で、A-I の結合性の変化を反映していることを上手く説明できた。また表面膜中のコレステロールの増加によって C-II の結合性は著しく減少するが、E の結合性は変化しないこと、更にコレステロールを含有しないエマルションのコアを TG から CO に変化させると E の結合量は半分になるが A-I や C-II の結合性の変化は小さいことが明らかになった。これらエマルションの組成変化に対するアポタン白質の結合の応答性の違いはリポタン白質の脂質組成と結合アポタン白質の関係と一致する。

上述のようにエマルション表面膜の構造を界面化学的および蛍光分光学的手法を用いて評価し、さらに

膜質組成の変化による表面積とコアの状態変化，およびアポタン白質の結合性の変化について明らかにした。これらの結果はリポタン白質の代謝過程でのアポタン白質の親和性の変化のメカニズムについて新しい知見を示すだけでなく，DDS 素材としての脂質エマルションの体内動態制御への有用な情報を提供するものである。よって本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。更に平成 9 年 2 月 24 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果，合格と認めた。