

学位論文題名

固定化単層リポソームカラムを用いた生体分析及び クロマトグラフィーによる酵素反応の解析

学位論文内容の要旨

序言：リポソームは生体膜のモデルとして、薬物、蛋白質、ペプチドなどの生理活性物質と細胞膜の相互作用の研究によく使われている。いままで、平衡透析法、沈殿法、ろ過法などが典型的な手法として使われている。固定化リポソームカラムクロマトグラフィー(ILC)は新規手法として近年開発された。この方法は、リポソームを担体（例えば、ゲル）に固定化して、得られたリポソーム固定化ゲルをクロマトグラフィーのカラム充填材として使用する。ILC法は次の5つの特徴がある：1) 薬物、ペプチドと膜の相互作用を定量化するのが可能である。2) 高い再現性 3) 保持時間を精密に測定することによって、弱い反応の検知も可能である。4) 実験条件の制御、例えば、pH、温度、イオン強度などの制御が容易である。5) 自動化とオンライン測定が可能である。そこで、ILC法は特に生体関連の分析技術として大きな期待が寄せられており、この技術を利用したいろいろなアプリケーションが注目されている。

本研究では、アビジン-ビオチン間の特異結合を利用して、サイズの均一な単層膜リポソームを固相（ゲル）に固定化した。固定化単層膜リポソームでは、固定化量が高く、1年以上の長期保存が可能であるなど安定性に優れており、信頼性の高い完全なリン脂質膜を提供出来ることから、生化学的な分析や生物工学的応用において使用することが可能である。ILC法を用いて、以下の研究を試みた。生体膜への薬物吸収の予測、生体分子と生体膜の相互作用の分析、センサーのためのシグナル増幅とその応用。

結果と考察

1. ILC法による薬物-膜相互作用の分析

アビジン-ビオチン間の特異結合によって、サイズの異なる単層膜リポソームをゲルに固定化した。固定化単層膜リポソームでは、固定化量が高く、安定性に優れており、信頼性の高い完全な膜が得られた。クロマトグラフィーの結果より、リポソーム固定化カラムを使用することによって、薬物分子の固相における保持時間はリポソームフリーのカラムより大幅に延長することが分った。薬物の膜への分配係数(K_{LM})は薬物の保持体積から測定した。膜分配係数(K_{LM})に対して、リポソームのサイズ、構造（単層或いは多層）、表面電荷、膜流動性、温度の影響について調べた。文献値と比較した結果、負に荷電したリポソームもしくはコレステロールを混合したリポソームを使用する場合、ILCによって、薬物と膜の相互作用を

解析できることを示した。本研究では、種々のよく知られている薬物を対象とし、卵ホスファチジルコリン(EPC)：ホスファチジルセリン(PS)：ホスファチジルエタノールアミン(EPE)：コレステロール(cholesterol) (5:1:2:2 モル比) で構成されるリポソーム固定化カラムにより分析を行った。薬物の $\log K_{LM}$ 値は Caco-2 細胞への透過性と非常に良く相関することが明らかとなった。さらに、 $\log K_{LM}$ 値とヒトの経口薬物吸収量の関係から、 $\log K_{LM}$ 値が薬物の受動的な細胞吸収の予測に使用できることが示された。従って、ILC 法は創薬における初期段階の莫大な数の化合物をスクリーニングする必要がある場合に非常に有用であると考えられる。

2. ILC 法を用いた脂質陽イオン-膜相互作用の熱力学的解析

脂溶性脂質陽イオントリフェニルホスニウム同族体の固定化リポソームへの分配係数を ILC 法によって解析した。脂溶性脂質陽イオンの膜内の滞留時間は分子の疎水性の増加によって増大することが解った。これは、脂溶性脂質陽イオンがリポソーム膜の疎水性部分に分配していることを意味している。この陽イオンとリポソーム膜の相互作用に対する陽イオンの濃度、流速、ゲルの種類の影響について調べた。得られた熱力学的量 ΔH° 、 ΔS° 、 ΔG° に対して、解析した結果、陽イオンの疎水性を増大すると、 ΔG° は減少して、 ΔH° 、 ΔS° は増大する。これは陽イオンのリポソーム膜への分配過程はエントロピー制御過程であることを暗示している。

3. 溶質-脂質膜の相互作用の蛍光オンライン分析

蛍光物質(カルセイン)を内包したリポソームを ILC に用いて、溶質分子(薬物、蛋白質、陽イオン、ペプチド)とリポソーム膜の相互作用によって、膜の構造に影響し内包された蛍光分子が漏出する。その漏出蛍光をオンライン蛍光検出装置で計測した。その結果、薬物-膜、陽イオン-膜間の相互作用に対する蛍光漏出量と $\log K_{LM}$ 間の線形関係が見出された。疎水性陽イオン、両性化合物、合成ペプチドの膜透過性は分子の保持時間の増大という結果からも明らかであった。部分変性されたカルボニックアンヒドラーゼ(CAB)を用いた場合、クロマトグラフィー上の滞留が検知できない大きな蛍光漏出が観察された。このことから、蛋白質-膜の弱い相互作用でもオンライン蛍光漏出分析によって明瞭に観察できることがわかった。これは部分変性蛋白質の性質に関して、重要な情報が提供できると考えられる。

4. 蛍光物質内包した ILC におけるホスホリパーゼ PLA_2 (PLA₂) による蛍光オンライン検出

PLA₂ のリン脂質の加水分解作用を調べるために本実験では ILC を用いて、PLA₂ の触媒作用による膜漏出について調べた。少量の PLA₂ をリポソームカラムに投入し、リポソームに内包された蛍光物質の漏出をオンライン蛍光検出装置で検出した。PLA₂ による膜漏出はゲルのポアサイズ、リポソームのサイズ、蛍光物質の濃度に強く影響されることが解った。LUV、TSK 或いは Sephacryl ゲル、 Ca^{2+} 濃度が 1mM の水溶液の条件で、PLA₂ による膜漏出は最大値を示した。さらに、PLA₂ の応用例として、抗 PCB 抗体を用いた PCB の新規検出法を開発した。本検出法は、ターゲット物質と PLA₂-ターゲット物質コンジュゲートの抗体に対する競合的結合を用いる。この競合的結合を行う第 1 カラムとして、抗 PCB-IgY を固定化した抗体固定化カラムを作製した。第 2 カラムとして、蛍光物質カルセイを封入したリポソームを固定化したリポソームカラムを作製した。溶出した PLA₂ コンジュゲートによってリポソームが破壊され、カルセイの漏出が起こる。はじめに PLA₂ に 3,4-ジクロロアニリンを固定化したコン

ジュゲートを作製した。作製したコンジュゲートは野生型 PLA₂ の約 50% の活性を有していた。このコンジュゲートを用い、種々濃度の PCB 溶液の測定を行った。PCB 濃度とカルセイ漏出量の相関性を評価した結果、PCB 検出限界はおよそ 10ng/ml であり、既に報告されている PCB-蛍光物質コンジュゲートを用いた競合法と比較し、100 倍高感度な検出が可能であった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 茂 直 樹

副 査 教 授 原 島 秀 吉

副 査 助 教 授 井 関 健

副 査 助 教 授 宮 内 正 二

学 位 論 文 題 名

固定化単層リポソームカラムを用いた生体分析及び クロマトグラフィーによる酵素反応の解析

薬物、蛋白質、ペプチドなどの生理活性物質と細胞膜との相互作用の研究の際に、細胞膜が脂質 2 分子膜を基本構造とすることから、リポソームがモデル膜として頻用されている。相互作用の研究方法として、いままで、平衡透析法、沈澱法、急速ろ過法などが用いられている。近年、リポソームをゲルに包括してカラムとし、クロマトグラフの技法を用いて、相互作用を測定する方法が提案されている。この方法を固定化リポソームカラムクロマトグラフィー (Immobilized Liposome Chromatography, ILC) と申請者は呼んでいる。ILC 法には種々の長所を有する。それらは、1) 相互作用の定量化が容易、2) 高度な再現性、3) 滞在時間 (retention time) の精度のよさに起因する弱い相互作用の定量化が可能、4) 実験条件の制御が容易、5) 自動化とオンライン測定が可能等である、これらの長所を持つものの、従来は単にゲルとリポソームを混ぜるだけ (包括法) で作製され、安定性に欠け、上記の潜在的な長所が発揮出来ていなかった。

そこで、申請者はアビジン-ビオチン間の強固な結合を利用して、サイズ均一の単層膜リポソームをゲルに固定化する方法を開発した。繰り返し使用しても、1 年間も安定して再現性よく滞在時間測定できる ILC を完成させた。この ILC を使用して以下に述べるような研究を展開した。

1. ILC 法による薬物-膜相互作用

エッグフスファチジルコリン，ホスファチジルセリン，ホスファチジルエタノールアミン，コレステロールが 5:1:2:2 のモル比からなるリポソームを用い，種々の薬物の脂質膜への分配係数を測定した．Caco-2 培養細胞の薬物透過速度と比較してよい一致をみた．

2. ILC 法を用いた脂質陽イオン-膜相互作用の熱力学的解析

脂溶性ホスフォニウムイオンは微少細胞の膜電位を測定するプローブである．これらのイオンは，イオンであるにも拘わらず，膜を自由に透過出来る．それらのイオンの脂質膜への吸着定数を ILC で精密に測定し，熱力学的パラメータを推定した．すでに他の研究者によって得られていた膜透過係数を用いて，膜透過の機構を論じている．

3. 溶質-脂質膜の相互作用の蛍光オンライン分析

固定化リポソームの内部に蛍光色素カルセインを高濃度に封入しておくと，自己消光のために蛍光がでない．溶質が膜と相互作用すると，カルセインが外部に流失し蛍光性となる．これと ILC を組み合わせて，極めて高感度な溶質-脂質膜相互作用の測定法を確立した．

4. 高感度 PCB センサーの構築

上記の ILC と抗 PCB の抗体を用いた高感度 PCB センサーを構築した．これは，ターゲット物質とフォスホリパーゼとターゲット物質コンジュゲートの抗体を組み合わせたものである．文献上，最高の検出感度を得ている．

このように，本研究は，薬学博士の称号を授与するのに十分な研究であると認めた．