

# リン脂質ベシクル上にリポアミノ酸が形成するナノチャンネルとその薬物放出能の検討

金沢大学大学院自然科学研究科

太田 明雄

Incorporation behavior of N-amino acid-type surfactant into phospholipid vesicle membrane has been studied. It was known that leakage of the vesicle-entrapped probe took place slowly at a very low concentration in the sulfate- or sulfonate-type surfactant systems, on the other hand it occurred rapidly at the concentration just below the CMC in the amino acid-type surfactant systems. These results suggest that the amino acid-type surfactants adsorb cooperatively on the vesicle surface, and as a result, the surfactant molecules organize to make a kind of channel which is large enough for the entrapped molecules to pass through easily. In this study, the effect of amino acid residue on the incorporation into the vesicle membrane was investigated from the both view points of morphology and interaction. Furthermore the control of the release of entrapped-molecules from vesicles by temperature or pH was examined.

## 1. 緒言

これまでアシル化アミノ酸に代表されるアミノ酸系界面活性剤は肌に優しくマイルドな界面活性剤として認知され、またその特性を生かした商品も数多く開発されている。またアミノ酸の種類を選ぶことにより、官能基を系統的に変化させることができるため、親水部位のサイズや極性、電荷といったものが界面活性剤の物理化学的性質に及ぼす影響を検討する上でも、都合の良い対象である。更にグリシンを除くアミノ酸は光学活性体であり、分子不斉といった観点からも非常に興味深い対象である。実際アシルアミノ酸塩を扱った研究について、総説として既に多くが紹介されている<sup>1) - 7)</sup>。しかしながら、生体に対して“マイルドである”とは物理化学的にどのようなことなのか、そのメカニズムは詳細には明らかにされていない。そこで我々はこれまで蓄積してきたアミノ酸系界面活性剤の研究手法や成果を生かし、上記のメカニズムを脂質膜（リン脂質ベシクル）とアシルアミノ酸界面活性剤（リポアミノ酸）との相互作用という観点から明らかにすることを目的として実験を進めているが、その中で硫酸エステル系やスルホン酸系界面活性剤と、アミノ酸系界面活性剤ではベシクルに対する作用が全く異なる事が明らかとなった<sup>8)</sup>。前者の界面活性剤と比較してアミノ酸系界面活性剤のベシクルへの作用としての主な特徴は、1) ベシクルへの作用に対し協同性を有し、ある臨界濃度が存在する（臨界ミセル濃

度 CMC よりも低濃度）；2)（その臨界濃度以上で）ベシクル二分子膜構造を破壊することなしに内包物を放出させる；3) 内包物の放出速度が大きい；ということである。これらの事実より、アシルアミノ酸界面活性剤（リポアミノ酸）はベシクル二分子膜上に協同的に吸着し、内包物の通り道（チャンネル）を形成しているのではないかと推測した。そこで本申請研究では、a) リポアミノ酸のリン脂質ベシクルへの作用様式とその形態観察、b) そのアミノ酸側鎖の影響を系統的に検討した。さらにこの作用を利用して、温度や pH による内包薬物の放出制御を試みた。

## 2. 実験

リン脂質として L- $\alpha$ -ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) を選んだ。ベシクルは Bangham 法にて作成した後、ポリカーボネートメンブランを用いたエクストルージョン法にて、約 100nm 径を有する均一のユニラメラベシクルとして調製した。内包薬物のモデルとして 5(6)-カルボキシフルオレセイン (CF) を利用し、濃度消光するような濃度 (0.1M) にて封入した。CF を封入したベシクル分散液は 100nm にサイジングした後、封入できなかった CF をゲルろ過にて除去した。薬物放出実験の場合では、DPPC 濃度は 0.05mM に調製し、界面活性剤を添加した後の CF 蛍光強度の回復度より漏出率を見積もった。アシルアミノ酸界面活性剤として N-ドデカノイル-グリシン (C12-Gly)、L-アラニン (C12-Ala)、L-ロイシン (C12-Leu)、L-フェニルアラニン (C12-Phe) およびドデカノイル-L-セリン (C12-Ser)、L-アスパラギン (C12-Asn)、L-グルタミン酸 (C12-Glu) の各ナトリウム塩を使用した。これらの界面活性剤の構造式を Schem1 に、また Tris-HCl 0.1M (pH = 7.4) 緩衝液中における CMC を Table 1 にそれぞれ示した。アシルアミノ酸のベシクルへの作用様式は恒温滴定型カロリメトリー (ITC) と 300kV Cryo-



Investigation on nano-channels made from lipo-amino acid surfactants on phospholipids vesicles

Akio Ohta

Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University

TEMによる形態観察を位相差法により非染色の条件下で行った。Cryo-TEMによる形態観察ではDPPC濃度は2mMで固定し、アシルアミノ酸濃度を変化させて実験を行った。また各サンプル調製には、Tris-HCl 0.1M (pH = 7.4) 緩衝液を溶媒として使用した。内包薬物の放出制御の実験では、他にpH = 6.0と8.2の緩衝液も溶媒として使用した。これらはTris-HCl 0.1M (pH = 7.4) 緩衝液に、それぞれHCl、NaOH水溶液を適量加えることで調製した。

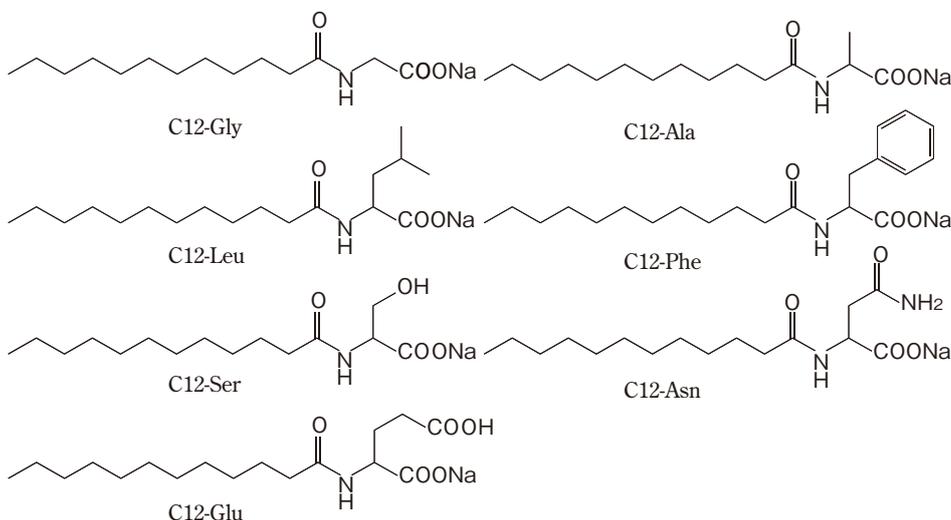
### 3. 結果と考察

Fig. 1に界面活性剤の添加直後と2時間後のCF漏出率を、各CMCで換算した界面活性剤濃度 ( $C^* = C/CMC$ ) に対してプロットしたものである。なお漏出率  $L$  は各点における蛍光強度  $I$ 、界面活性剤添加以前の蛍光強度  $I_{bg}$ 、ならびにTritonX-100を添加することで完全にベシクルを崩壊させた後の蛍光強度  $I_{triton}$  から以下の式により計算している。

$$L(\%) = \frac{I - I_{bg}}{I_{triton} \times r - I_{bg}} \times 100$$

なお  $r$  は TritonX-100 を添加することによる希釈率を表しており、今回のケースでは1.1とした。いずれのアシルアミノ酸界面活性剤の場合でも、かなり低い濃度ではベシクルの漏れを殆ど引き起こさないものの、CMCよりも低いある濃度に達すると急激に漏出率が上昇しているこ

とがわかる。比較としてドデシル硫酸ナトリウム (SDS) の系を示した。SDS系では低濃度からすでに漏れが生じ、CMCに近づくにつれ徐々に漏れ率が上昇するものの、2時間後でもそれほど大きな漏れを引き起こしていないことがわかる。両者を比較するとそのアシルアミノ酸界面活性剤の作用における協同性が顕著であることがよくわかる。次にアミノ酸の違いについて検討することにする。まず疎水性アミノ酸で比較すると側鎖が嵩高いLeu, Pheではその漏れ速度が非常に高く、側鎖の小さなGlyとAla系ではその速度が低いことがわかる。特にPhe系ではCMCの20%程度の低濃度の溶液においてさえ、ベシクル添加後2時間以内に内包物を完全に放出させている。一方親水性アミノ酸であるSer, Asn, Glu系はそれぞれ異なる挙動を示した。側鎖に水酸基を有するSer系は添加直後の漏れ率は低いもののLeu, Phe系に似たような挙動を示した。これに対しアミド基を有するAsn系はGly, Ala系の挙動に似ているが、漏れ率は他の系と比べて小さかった。なお後者の系では、CMC以降の高い濃度領域で漏出率が再度減少している。この原因については未解明であるが、現時点では界面活性剤ミセルとDPPCベシクルとの複合体が形成されたためではないかと考えている。側鎖にカルボキシル基を有するGlu系も同様に、CMC後に漏れ率の低下を示したが、この系に関してはCFはC12-Gluミセルに可溶化されると顕著に消光されることがわかっており、この蛍



Scheme 1 使用したアシルアミノ酸界面活性剤の分子構造

Table 1 各界面活性剤の臨界ミセル濃度 (25°C in 0.1M tris-HCl pH = 7.4)

	SDS	C12-Gly	C12-Ala	C12-Leu
CMC / mM	1.1	3.0	3.0	0.60
	C12-Phe	C12-Ser	C12-Asn	C12-Glu
	0.35	4.1	4.8	14.0

光の消光により見かけの漏れ率が減少したものと思われる。

次に DPPC ベシクル懸濁液と界面活性剤水溶液との微分希釈熱測定を行った。なお DPPC 濃度は蛍光実験の際に使用した量と同じ濃度になるように適量をセルに添加し、各界面活性剤の CMC の 20 倍の濃厚水溶液を滴下した。DPPC ベシクル存在下、非存在下での各系における界面

活性剤の微分エンタルピーの結果を Fig. 2 に、それぞれ Fig. 1 と同様に CMC で換算された濃度に対して示した。DPPC ベシクルが存在しない場合の微分エンタルピーは CMC 近傍で急激に変化し、CMC 前後のエンタルピーの差を取ることで、ミセル形成エンタルピーを得ることができる<sup>9)</sup>。その結果より SDS 系、C12-Phe 系ではミセル形

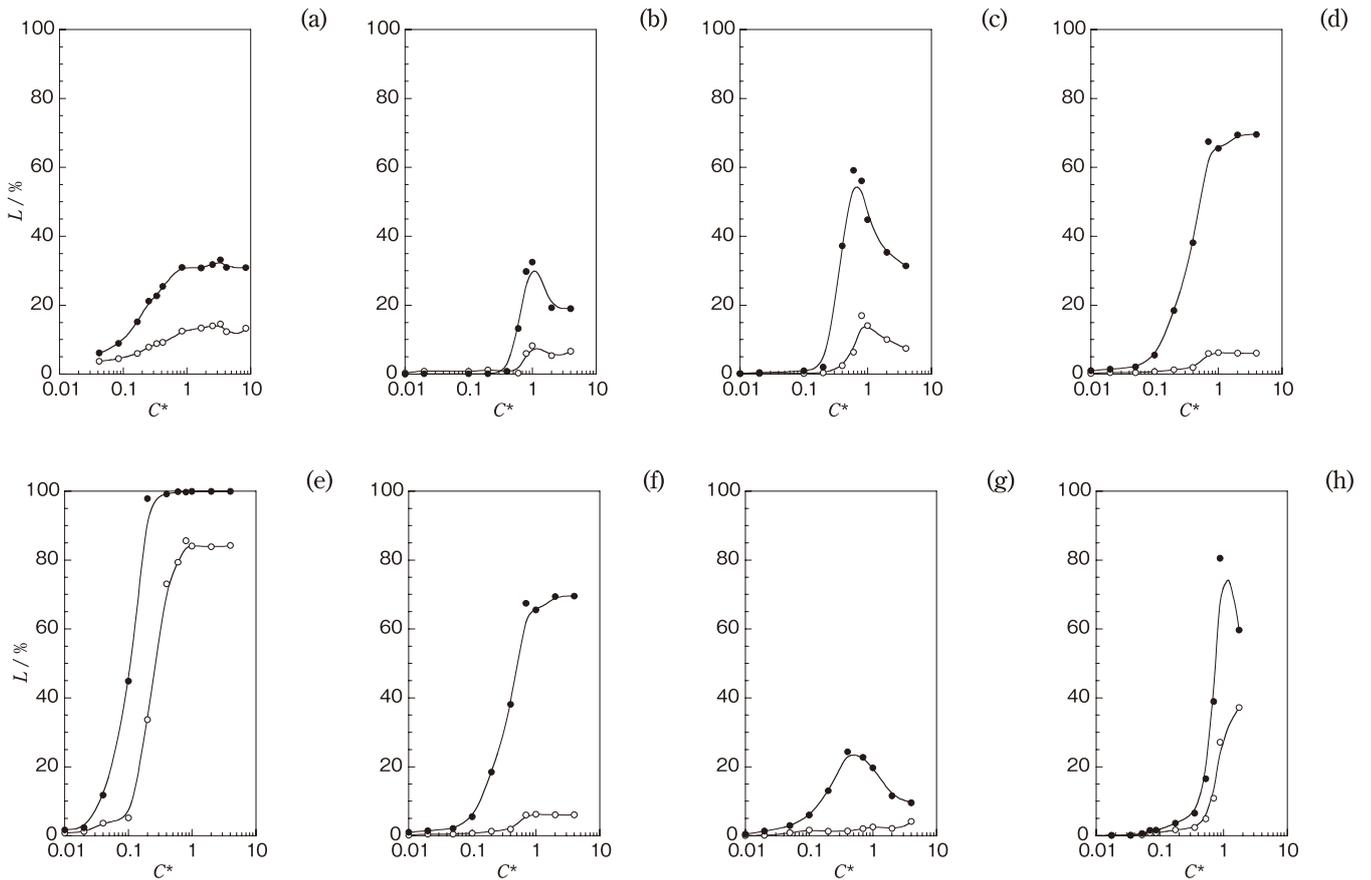


Fig.1 SDS および各アシルアミノ酸界面活性剤系におけるベシクル内包物の放出挙動。(○) 添加直後、(●) 添加 2 時間後 (a) SDS, (b) C12-Gly, (c) C12-Ala, (d) C12-Leu, (e) C12-Phe, (f) C12-Ser, (g) C12-Asn, (h) C12-Glu

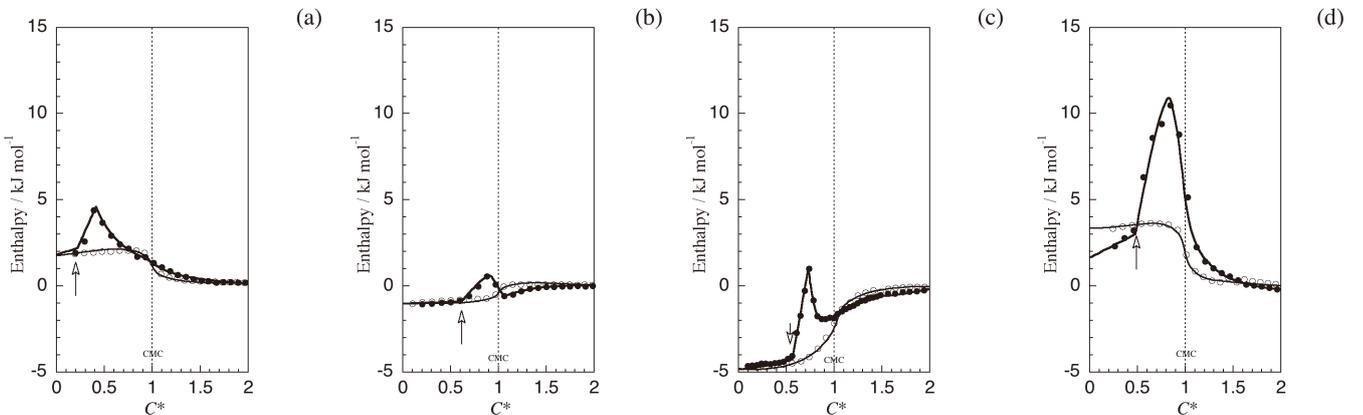


Fig.2 SDS および各アシルアミノ酸界面活性剤系における界面活性剤の微分エンタルピー (○) 界面活性剤のみ、(●) DPPC ベシクル共存下 (a) SDS, (b) C12-Gly, (c) C12-Leu, (d) C12-Phe.

成は発熱的であり、C12-Gly と C12-Leu 系では逆に吸熱的であることがわかる。一方 DPPC ベシクルが存在した場合、このミセル崩壊のプロセスに伴う熱の出入りに加え、ベシクルへの界面活性剤の作用に伴うエンタルピー変化が加わることになる。SDS 系では比較的低濃度から DPPC が存在しない場合の希釈熱のカーブからずれ始め、CMC の 50% 程度の濃度において最大値に達し、その後単調に減少した。C12-Gly と C12-Leu 系では CMC の 50% 程度の濃度まではほぼ一定の値であったが、最初の矢印の点で急激に上昇し、CMC の 80% 程度の濃度において極大値をとりその後 CMC に達した後 DPPC が存在しない場合の希釈熱のカーブと同様の挙動を示した。これらの結果は上述した各界面活性剤におけるベシクル膜への作用様式を強く支持している。つまり SDS 系では低濃度領域から単調に作用しているのに対し、C12-Gly と C12-Leu 系では最初の矢印の点まではベシクル膜に対してエンタルピー的には殆ど影響を与えていないものの、ある濃度に達すると協同的に作用することになる。また界面活性剤が作用した際の大きな吸熱は、主に DPPC ベシクル膜のパッキング状態の緩和を反映したものと思われる。その後は添加された分子は膜上のドメイン形成に消費され、界面活性剤モノマー濃度が CMC に到達するとミセルが形成され、DPPC 分子はミセル内に可溶化されていくものと思われる。一方 C12-Phe 系では、非常に希薄な濃度においては DPPC が存在しない場合の希釈熱のカーブから負の方向にずれており、低濃度における吸着が発熱的であることを示している。その後他のアシルアミノ酸型界面活性剤と同様に CMC の 50% 程度の濃度付近から急激に上昇し、CMC 付近で極値をとった後減少した。C12-Phe 系での極大のエンタルピーは他の界面活性剤に比べ非常に大きな値を示した。この結果は先の内包物の漏れ挙動の結果と対応しているように思われる。すなわち C12-Phe はベシクルに対して非常に強く作用する結果、内包物の素早い漏れを引き起こしたのではないかと考えられる。

次に各界面活性剤ミセルの DPPC 分子の可溶化能を検討するために、先の実験とは逆の滴定測定を行った。具体的にはセル内の各 CMC の 4 倍濃度のミセル溶液中に DPPC ベシクル懸濁液を滴定し、その際に発生する熱を測定した。結果を DPPC の微分エンタルピーを DPPC の濃度に対して Fig. 3 に示した。各界面活性剤系ともに比較的大きな正の値を示し、DPPC 濃度の上昇とともに減少するような挙動を示した。なおグラフ内に示した実線は、回帰曲線に分数関数 ( $f(C_{\text{DPPC}}) = P1 + P2/(P3 + C_{\text{DPPC}})$  : P1, P2, P3 は可変パラメータ) を用いてフィッティングしたものであるが、実験結果をうまく再現できている。また DPPC 濃度が無限希釈に近づくにつれ、各系の値は同じような値に収束していくように見える。この無限希釈で

の値は DPPC 分子がベシクル状態からミセル内に移行する際のエンタルピー変化に相当するが、このことは DPPC の可溶化に伴うエンタルピー変化は界面活性剤の種類にあまり依存しないことを示している。実際に得られた回帰曲線から DPPC 濃度がゼロの極限値を算出したところ、それぞれ 36 ~ 42 kJ mol<sup>-1</sup> 付近の値を示した。なお DPPC ベシクルは 42℃ 付近でゲル状態から流動性の大きな液晶状態への転移を示すことが知られているが<sup>10)</sup>、その相転移の潜熱が約 36 kJ mol<sup>-1</sup> である<sup>11)</sup>。可溶化に伴うエンタルピー変化とほぼ同等であることから、界面活性剤ミセル中での DPPC の状態は液晶状態に似通っているといえる。しかしながら DPPC 濃度が上昇するにつれ、各界面活性剤系における微分エンタルピーの差が拡大している。詳しく見てみると、SDS 系では比較的那の減少度が小さいのに対し、アシルアミノ酸界面活性剤系ではそのエンタルピー値がより急激に減少した。これはミセル中での混和性の違いを反映しているものと思われる。つまり DPPC はアシルアミノ酸界面活性剤ミセル中よりも、SDS ミセル中でより界面活性剤と混和しているものと思われる。この結果はこれまで考察してきた DPPC ベシクル内での界面活性剤の混和性の違いと共通している。

これらの結果をもとに、C12-Gly、C12-Leu と C12-Phe 系に対して、幾つかの濃度において、cryo-TEM によるベシクルの形態観察を行った。結果はそれぞれ Fig. 4 に示した。Fig. 4a は C12-Gly (C\* = 0.6) における像であるが、漏れ挙動や熱測定の結果からは既にベシクルに対して作用し、内包物を漏れさせているにもかかわらず、ほぼその粒径を保ったユニラメラベシクル像を得ることができた。一方同じ濃度 (C\* = 0.6) における C12-Leu 系 (Fig. 4d)、C12-Phe 系 (Fig. 4f) では、C12-Gly 系と同様に急激な漏れの発生や大きな正のエンタルピー変化を起すという点では似通った挙動であるにも関わらず、その形態が異なっていた。C12-Leu 系ではほとんどのベシクルはカプセル形を保っていたが、その輪郭は円形ではなく多角形であった。更に写真にあるような一部にはシートに転移したものが観察できた。なおそのシートへ転移したものの存在比は 1% 以下であった。C12-Phe 系ではその違いが著しく、球状ベシクルは全く観察されず、全てのベシクルがシートへと転移していた。C12-Leu、C12-Phe 系で見られた内包物の急激な漏れは、ベシクルの形態をカプセル状からシートへと転移させることに起因しているものと思われる。またベシクルの輪郭が多角形に近いような形が得られたことは、界面活性剤がベシクルに均一に作用しているのではなく局所的に作用していることを裏付けているように思われる<sup>12)</sup>。つまり部分的に吸着した結果、DPPC リッチドメインと界面活性剤が吸着した部分との間に、ある種の界面が形成されたためではないかと考えている。次に、C12-Leu、C12-

Phe系において漏れが起こり始める濃度 ( $C^* = 0.1$ ) における画像を検討してみる (Figs. 4c, 4e)。この濃度においてはどちらの系ともにシート構造は殆ど確認できなかったが、やはりベシクルの輪郭は多角形であった。これらのことから C12-Leu、C12-Phe 系の場合では、ベシクルへの局所的な作用は低濃度から既に起こっており、濃度が上昇するにつれ過度なドメイン形成が、カプセルを崩壊させシートへと転移させていることが予想される。最後に Fig. 4b の C12-Gly ( $C^* = 4$ ) における像について触れてみる。画像にあるように一部には疎水性アミノ酸系で見られた多角形状の輪郭が得られたものの、観察できたベシクルは全てカプセル状であった。漏れ挙動の結果において C12-Gly 系を含む幾つかの系では、CMC 後に漏れ率が減少するという特異な挙動を示しているが、TEM 画像からは形態の変化など特に変わった様子は見られなかった。

以上の結果より、界面活性剤の作用によりベシクルの形

態転移を引き起こすことで、漏出効率が高くなる C12-Leu と C12-Phe 系に対して、温度と pH の変化による内包物の放出挙動を検討した。またこれらの界面活性剤は CMC が低く、他の系に比べ添加量を抑えることができることも利点として挙げられる。なお内包物には同様に CF を用いた。まず両系ともに CMC の 4%、ならびに 40% の濃度での結果を Fig. 5 に示した。この結果より、温度を上げることで内包物が放出されやすくなることがわかった。これは界面活性剤の作用によるベシクル形態の転移が温度の上昇により促進されたためだと思われる。特に CMC の 4% では、25℃ 以下の温度においては全く漏れを生じさせていないが、35℃ まで温度を上昇させることで内包物を速やかに漏出させることができることがわかった。なお C12-Leu、C12-Phe 両系とも CMC の 40% 濃度においても、DPPC の二分子膜の相転移温度は 35℃ 以上であることを確認している。同様に Fig. 6 に示したように、pH については低下

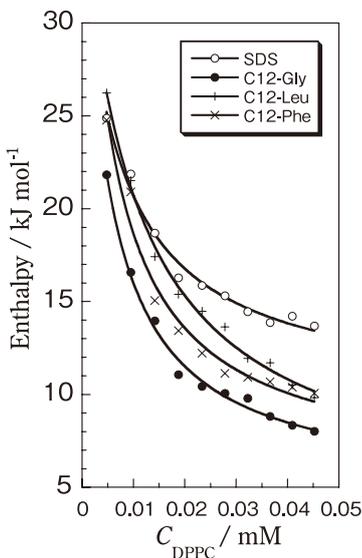


Fig.3 各界面活性剤ミセル水溶液中における DPPC の微分エンタルピー

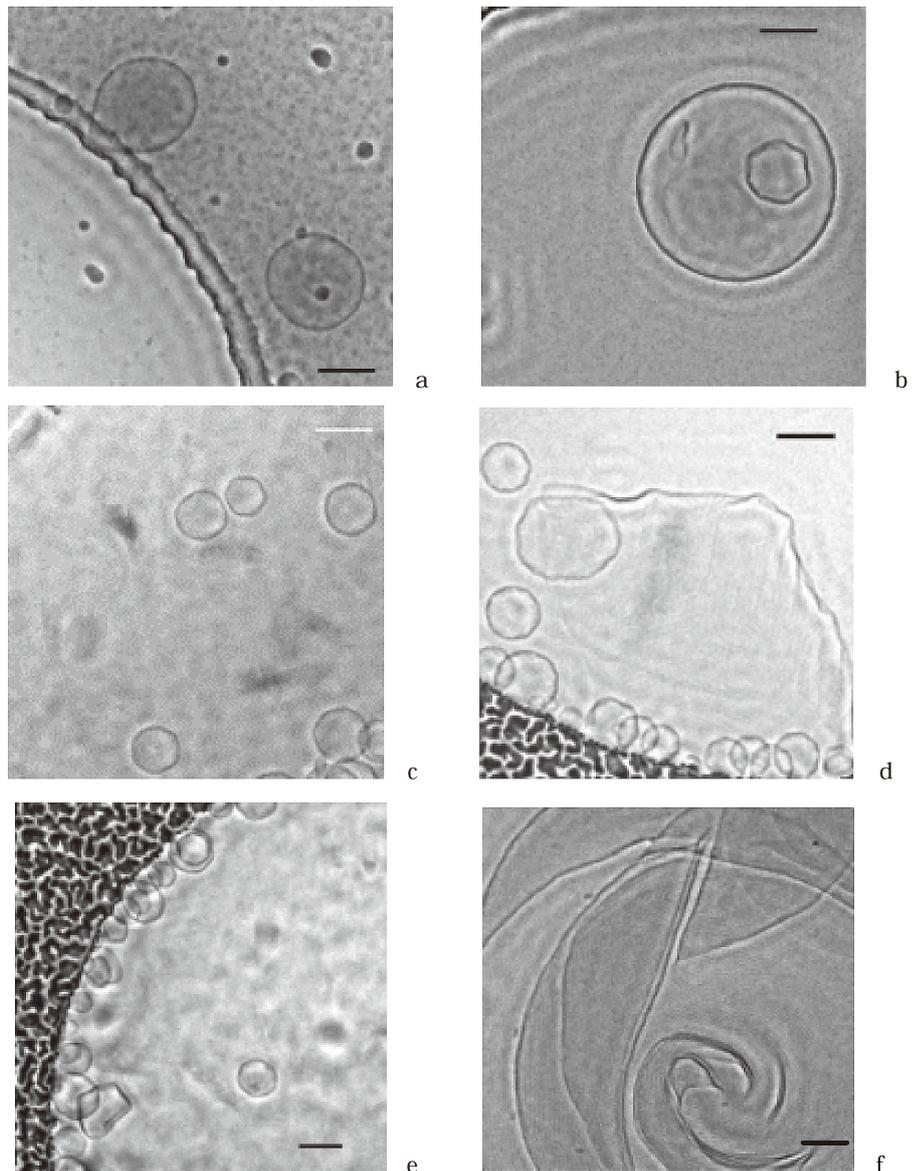


Fig.4 各界面活性剤系におけるベシクルの形態  
 (a) C12-Gly,  $C^* = 0.6$ , (b) C12-Gly,  $C^* = 4$ , (c) C12-Leu,  $C^* = 0.2$ , (d) C12-Leu,  $C^* = 0.6$ , (e) C12-Phe,  $C^* = 0.1$ , (f) C12-Phe,  $C^* = 0.6$  (各 bar = 100nm)

させることで内包物が放出されやすくなることが分かった。特に pH を 7 から 6 へと僅かに下げることで劇的な変化をしており、両系とも CMC の 10% 程度の濃度においては、内包物の放出のオン・オフをほぼ完全に制御することが可能である。これらの界面活性剤の見かけの pKa は 7 前後であることから、界面活性剤のカルボキシル基の解離を抑えることで、ベシクルへの吸着量が飛躍的に向上し、その結果内包物の放出を招いたのではないかと考えられる。

#### 4. 結 言

アシルアミノ酸界面活性剤を用いたベシクル膜内包物の放出作用を系統的に検討した。これらの界面活性剤は SDS と比較すると、その作用が協同的であることが特徴としてあげられる。特に側鎖に嵩高い疎水基を有する

C12-Leu、C12-Phe 系では、速やかな放出能を有することがわかった。TEM 観察により、これらの系におけるベシクル膜への作用が局所的であり、かつその性質のため CMC 以下においてベシクル形態の転移を引き起こすことがわかった。このベシクル形態の転移が内包物の速やかな放出をもたらすことが予想される。更に添加する界面活性剤にこの C12-Leu や C12-Phe を用いることで、僅かな pH や温度の調節により、鋭敏にベシクル内包物の放出を制御できることがわかった。

#### 謝 辞

本研究を遂行するにあたり(財)コスメトロジー研究振興財団の支援をいただきました。ベシクルの熱測定は、北陸先端科学技術大学院大学教授 由井伸彦氏の協力により行

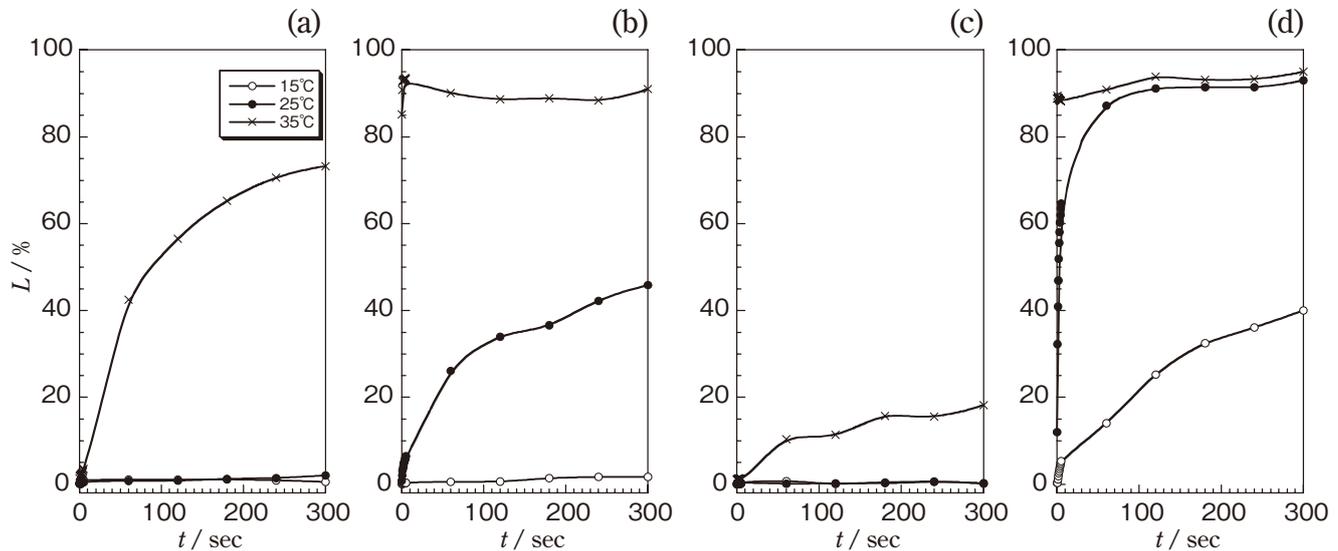


Fig.5 C12-Phe および C12-Leu 希薄溶液系におけるベシクル内包物放出挙動の温度依存性  
(a) C12-Phe,  $C^* = 0.04$ , (b) C12-Phe,  $C^* = 0.4$ , (c) C12-Leu,  $C^* = 0.04$ , (d) C12-Leu,  $C^* = 0.4$ .

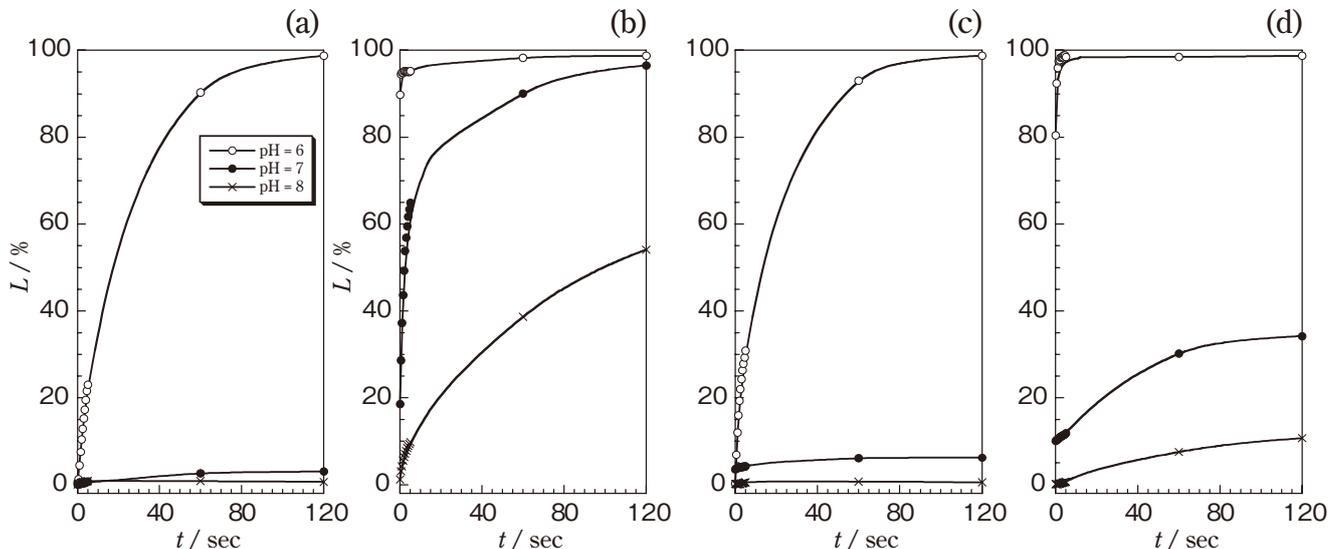


Fig.6 C12-Phe および C12-Leu 希薄溶液系におけるベシクル内包物放出挙動の pH 依存性  
(a) C12-Phe,  $C^* = 0.1$ , (b) C12-Phe,  $C^* = 0.4$ , (c) C12-Leu,  $C^* = 0.2$ , (d) C12-Leu,  $C^* = 0.4$ .

いました。また TEM 観察は、分子科学研究所「ナノ支援」プログラムの援助を受け、生理学研究所教授 永山國昭氏ならびに R.Danev 博士に多大なご協力をいただきました。この場を借りて深謝いたします。

(関連文献)

- 1) 吉田良之助, 竹原将博, 有機合成化学協会誌, 33, 671 (1975).
- 2) 吉田良之助, 竹原将博, 洪江昭夫, 薄羽恭謙, 油化学, 26, 747 (1977).
- 3) 竹原将博, 表面, 22, 459 (1984).
- 4) 竹原将博, 表面, 22, 512 (1984).
- 5) 竹原将博, 油化学, 34, 964 (1985).
- 6) 坂本一民, 油化学, 44, 256 (1995).
- 7) 宮岸重好, 表面, 35, 85 (1997).
- 8) Yasuhara K. Ohta A. Asakura Y. Kodama T. Asakawa T. Miyagishi S., *Colloid Polymer Science* 283, 8, p.987-993 (2005).
- 9) Ohta A., Murakami R., Takiue T., Ikeda N., Aratono M., *J. Phys Chem. B* 104(35), p8592-8597 (2000).
- 10) 八田一郎, 村田昌之: シリーズ・ニューバイオフィジックス II (4) 生体膜のダイナミクス, 共立出版 (2000).
- 11) Fa N., Ronkart S., Schank A., Deleu M., Gaigneaux A., Goormaghtigh E., Mingeot-Leclercq M. -P., *Chem. Phys. Lipids* 144, p108-116 (2006).
- 12) Ickenstein L.M., Arfvidsson M.C., Needham D., Mayer L.D., Edward K., *Biochim. Biophys. Acta* 1614, p1335-138 (2003).