

脂質と抗生物質の相互作用

井ノ内 直良*

Interaction of Antibiotics with Lipids

Naoyoshi Inouchi

アドリアマイシン (adriamycin) は *Streptomyces peucetius* の培地から得られるアンスラサイクリン (anthracycline) 系抗生物質であり、癌の化学療法の分野で近年最も広く用いられている薬剤のひとつである。したがってその作用機構は非常に注目されており、DNA と結びつく結果、DNA を鋳型とする RNA および DNA ポリメラーゼ反応を阻害することが主な作用メカニズムであると考えられている¹⁾。しかしながら、最近 DNA に対しほとんど親和性を示さず、核酸合成にもあまり影響を及ぼさないアドリアマイシンのアナログ、AD32 (N-trifluoroacetyl-adriamycin-14-valerate) がアドリアマイシンと同等以上の抗腫瘍性をもつこと²⁾、さらにこの種の抗生物質は細胞表面を変化させることが報告された^{3,4)}。そこでこの種の抗生物質が細胞表面のいわゆる生体膜に及ぼす影響を調べるのが重要な課題となってきた。熱測定による生体膜の研究は、天然の膜を対象とする場合と人工膜モデルについて測定を行う場合の二つの方向に分けてみる事ができる。ここでは著者がアメリカ Yale 大学化学部 Sturtevant 研究室において、Yale 大学と Vermont 大学の薬理学部との共同研究によって行った熱測定の手法による膜と抗生物質の相互作用の研究について述べてみたい。実験には膜モデルとして DPPC (dipalmitoyl phosphatidylcholin) や DPPG (dipalmitoyl phosphatidylglycerol) といった生体膜の主要構成成分である純粋な脂質を用い、抗生物質による脂質二重層の相転移の変化を調べるため Privalov の熱容量差測定装置 (DASM-1M) を使用した。脂質二重層の転移温度を正確に知るためには、精密な熱容量差測定法で過剰熱容量を求めるのが最も妥当であり⁵⁾、Privalov の熱量計が最も適している。すべての測定は脂質濃度 2.5 g/l (DPPC, DPPG とも 3.41 ± 0.15 mM に相当) の多重層小胞体 (multilamella vesicle) の状態のリポソーム

に種々のモル比の抗生物質を混合させて調製した試料を用い、昇温速度 0.25 K min^{-1} で行った。この昇温速度は膜の転移の測定の際に妥当と考えられている $0.1 \sim 0.5 \text{ K min}^{-1}$ ⁶⁾ の範囲内である。以下その結果について簡単に述べる。

1. DPPC (中性脂質) 二重層と抗生物質の相互作用⁶⁾

Fig. 1 のコントロールは 0.15 M , pH 7.4 の生理的リン酸バッファー (phosphate buffer saline; 以後 PBS と略す) 中に懸濁された DPPC の過剰熱容量曲線であり、 41.5°C にシャープなピークをもつ相転移 (main transition) と、小さくブロードな 34.7°C にピークをもつ相転移 (pretransition) を示す。これらの相転移は脂質二重層内にある疎水性部分である炭化水素鎖の規則的な配列が、温度上昇に伴い熱運動による乱れを生じるために起こる、いわば結晶の融解熱に相当する吸熱現象であると考えられる⁷⁾。アドリアマイシンはこの DPPC の相転移に変化を及ぼさない。ところが AD32 の場合、DPPC に対するモル比を増してゆくと、DPPC の main transition は徐々にピーク温度 t_m を低温側にシフトさせながら、ブロードなピークから 2 つのピークをもつようになり、pretransition は AD32 が比較的低濃度の段階で小さくなり消失する (Fig. 1)。このように AD32 は DPPC

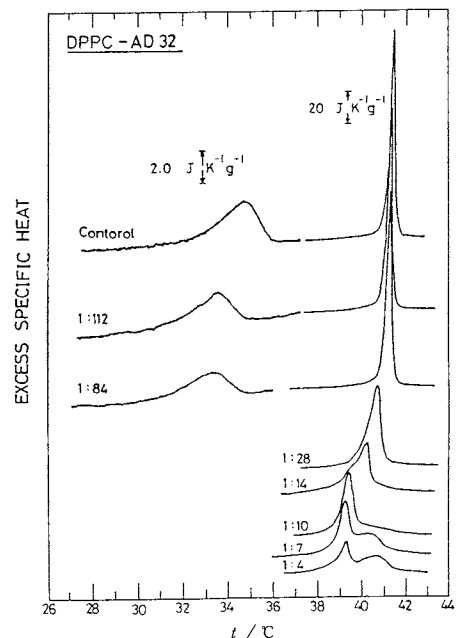


Fig. 1 DSC scans of DPPC containing various concentrations of AD32 in 0.15M PBS (pH7.4). (The drug:lipid molar ratio is indicated on each scan.)

* 桜井女子短期大学: 奈良県桜井市桜井 502 〒633
Sakurai Women's Junior College: 502 Sakurai,
Nara, 633 Japan

のリポソームの相転移に非常に大きな影響を及ぼし、アドリアマイシンと対照的である。アドリアマイシンがDPPCの相転移に有意な影響を与えないという結果はスピラベル ESR による研究結果とも一致しており⁸⁾、その理由としてアドリアマイシンとDPPCの中性脂質二重層との結合力が弱いため、またはアドリアマイシンがDPPCの固相と液相にはほぼ同じように結合しており相転移の際に変化としてあらわれないため、などの可能性が考えられる。前者の可能性は、脂質と薬剤との分配の程度を示すオクタノール/バッファー分配係数がアドリアマイシンの場合、AD32の値の約1%であること⁹⁾、脂質層のアドリアマイシンのモル分率と理想溶液理論¹⁰⁾から算出される t_m の低下はDSCによる検出限度の約0.1℃であること、などから十分考えられる。AD32のオクタノール/バッファー分配係数は99.9以上という高い値を示し、AD32とDPPCのモル比が1:14以下で観察される t_m のシフトはおおよそ理想溶液理論から予想される通りである。AD32がそれ以上の濃度の場合には複雑な相転移が観察されるが、これは非理想的な溶液状態を示すものである。この場合相転移は冷却、再加熱の際に可逆性を示さなかった。抗生物質のクロロプロマジンやある種の短鎖アルコールが高濃度に存在する場合には、脂質二重層の炭化水素は互いに混じり合って不可逆的な転移が起こるとの説¹¹⁾がある。AD32の高濃度におけるこの不可逆性の場合にも同様な説明が適用できるかもしれない。

次にアンストラサイクリン系以外の抗生物質についても調べてみた。クロロプロマジン(chlorpromazine)とグイニジン(quinidine)はホスファチジルコリンのリポソームに影響を及ぼすことが知られている¹²⁾。Fig. 2は各種抗生物質と脂質が1:14のモル比で混合した試料の過熱熱容量曲線である。Table 1にも示したようにクロロプロマジンはAD32よりもオクタノール/バッファー分配係数の値が小さいにもかかわらず、DPPCの t_m を低下させる効果はクロロプロマジンの方が大きい。この結果から、オクタノール/バッファー分配係数の値は薬剤の脂質への相対的な分配を表現するものであっても、相転移にはその他の要素も大きく影響することが明らかである。今回用いたどの抗生物質もDPPCのmain transitionのエンタルピー(29~34 kJ mol⁻¹)には有意な影響を及ぼさなかった。

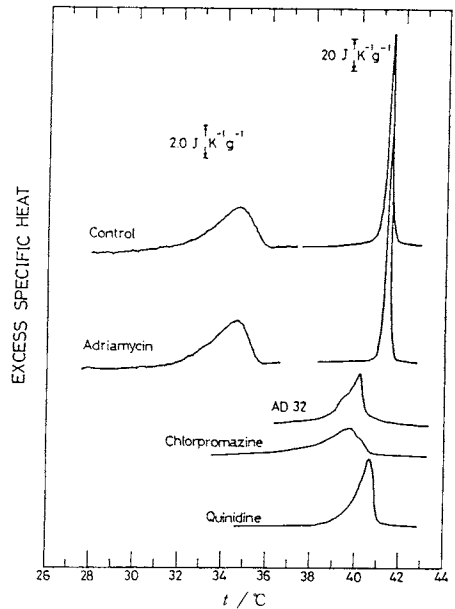


Fig. 2 DSC scans of DPPC containing various kinds of drugs in 0.15M PBS (pH7.4). (The drug:lipid molar ratio is 1:14.)

Table 1 Structures and octanol/buffer partition coefficients of the investigated drugs

Drug	Structure	Octanol/Buffer partition coefficient
Adriamycin		1.1 (Ref. 9)
AD32		>99.9 (Ref. 9)
Chlorpromazine		5.2 (Ref. 12)
Quinidine		1.8 (Ref. 12)

2. DPPG (酸性脂質) 二重層 と抗生物質の相互作用⁶⁾

酸性リン脂質はしばしば生体膜中に見出されており、AD32を除くアドリアマイシン、クロロプロマジン、グイニジンは中性のpHで正のチャージをもつので、負にチャージされたDPPGとこれらの抗生物質との相互作用を研究することは、静電気的効果を知る上で興味深い

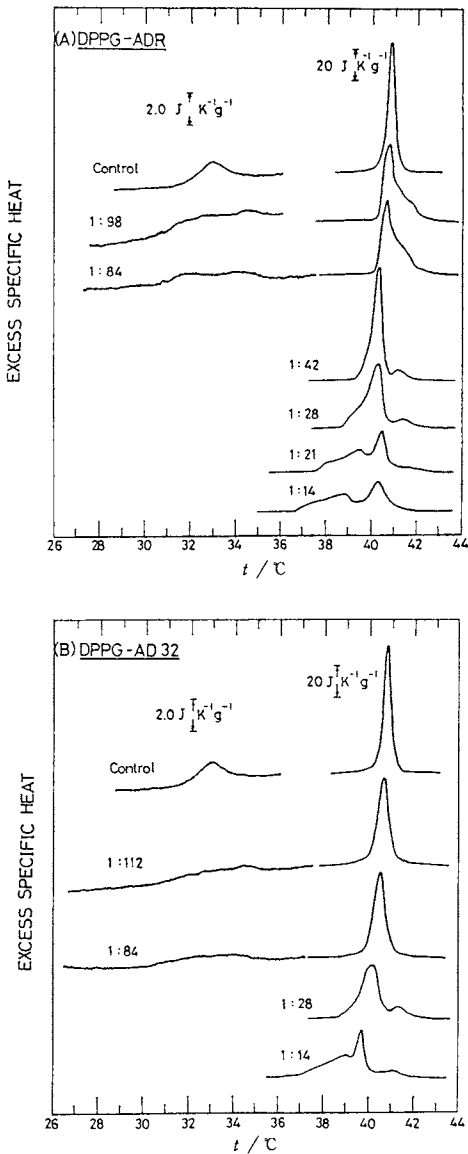


Fig. 3 DSC scans of DPPG containing various concentrations of (A) adriamycin (ADR) and (B) AD32 in 0.015M phosphate buffer (pH7.4). (The drug:lipid molar ratio is indicated on each scan.)

ことである。DPPGの転移曲線の形はpH、イオン強度、陽イオンの存在等によって大きく変化し、高いイオン強度やpHでは非常にシャープな転移を示す。またアルカリ性ではアンストラサイクリン系抗生物質は不安定である。そこでここでは、pH 7.4で低いイオン強度(0.015M)のリン酸バッファーが用いられた。

Fig. 3のA, BはアドリアマイシンとAD32がDPPGの相転移に及ぼす効果を濃度を変えて調べたものである。DPPGにアドリアマイシンを加えると転移曲線は大きく変化し、有意な変化がみられなかったDPPCの場合とは大きく異なった結果となる。これは静電気的相互作用によって、正にチャージしているアドリアマイシンが中性のDPPCよりも負にチャージしているDPPGの二重層により多く分配されたことを示している。低濃度のアドリアマイシンが存在する場合、main transitionの高温側に肩があらわれ、pretransitionは非常にブロードになる。中程度の場合、pretransitionは消失し、41°C付近に小さなピークをもったブロードなmain transitionに変化する。高濃度の場合には t_m はあまりシフトしないが、多くのピークが観察される。このことからアドリアマイシンがDPPG中で理想溶液を形成しないことは明らかである。低濃度のAD32が存在する場合には、単一でブロードなmain transitionが観察されるが、高

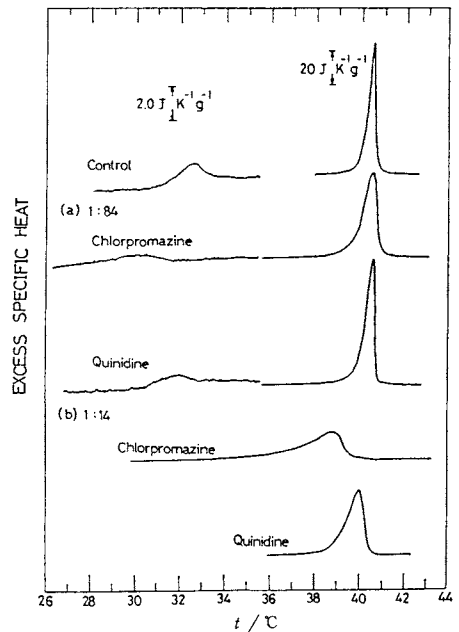


Fig. 4 DSC scans of DPPG containing chlorpromazine and quinidine in 0.015M phosphate buffer (pH7.4). (The drug:lipid molar ratios are (a) 1:84 and (b) 1:14.)

濃度の場合には main transition はアドリアマイシン同様多くのピークを示す (Fig. 3B)。

アドリアマイシンと AD32 が DPPG の相転移の過剰熱容量曲線に与える形の変化の違いを説明するのは困難であるが、ある種の薬剤と脂質の間で提唱されている特異的な形体形成^{13,14)}の結果であるかもしれない。アンササイクリン系抗生物質であるアドリアマイシンと

AD32 が DPPG の転移に及ぼす影響がユニークであるのは、Fig. 4 に示されたクロロプロマジンやゲイニジンと DPPG の過剰熱容量曲線と比較すると明らかである。この違いは DPPG の二重層中でのこのような抗生物質の構造や配向の違いは言うまでもなく、pK 値の違い、すなわちプロトン化の程度の違いによって説明されるであろう。

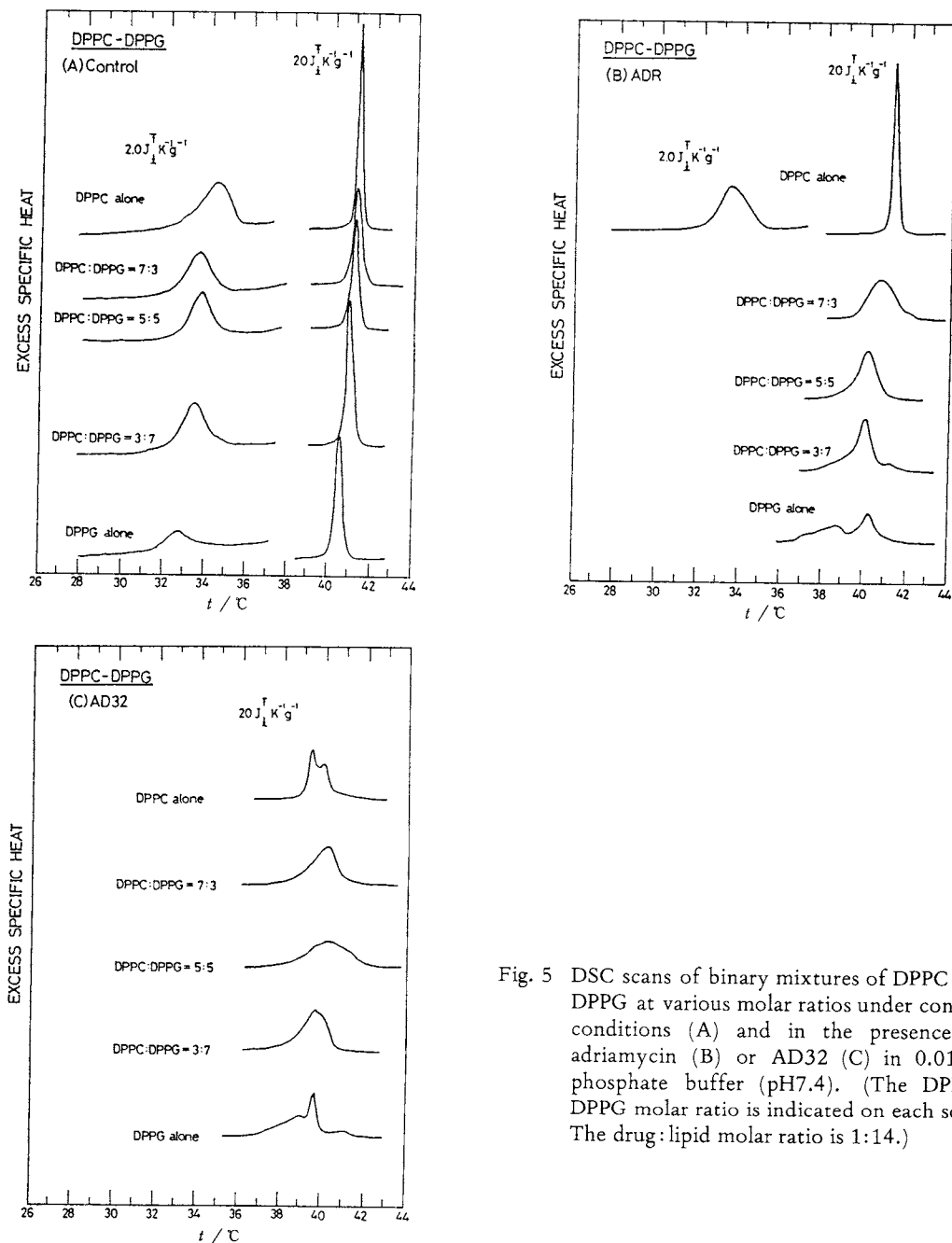


Fig. 5 DSC scans of binary mixtures of DPPC and DPPG at various molar ratios under control conditions (A) and in the presence of adriamycin (B) or AD32 (C) in 0.015M phosphate buffer (pH7.4). (The DPPC:DPPG molar ratio is indicated on each scan. The drug:lipid molar ratio is 1:14.)

3. DPPC/DPPGの混合系二重層(二成分膜)と抗生物質の相互作用⁶⁾

混合系のリン脂質のリポソームは、単一のリン脂質のもの比べると、いろいろな極性基や脂肪酸組成をもった多くの種類のリン脂質を含んでいる生体膜により近い膜モデルである。そこでアンストラサイクリン系抗生物質がDPPCとDPPGの二成分系のリポソームに及ぼす影響を調べることは興味深いことである。ここで同じ炭化水素鎖をもつDPPCとDPPGの混合物は理想溶液として取り扱うことができ¹⁵⁾、相分離の観察は報告されていない。実際今回行ったこの2種類の脂質のいろいろなモル比での混合物の熱測定でも、単一の脂質でみられるような転移曲線が観察された(Fig. 5A)。このDPPCとDPPGの混合二成分系にアドリアマイシンやAD32を加えると、pretransitionは完全に消失する(Fig. 5B, C)。アドリアマイシンはDPPC単独の系に対しては、その相転移に有意な影響を及ぼさなかったから、アドリアマイシンによる混合系の相転移の変化は、DPPC中に存在するDPPGの負のチャージのためであるのは明らかである。AD32は混合系のリポソームの転移の温度をあまり変化させないで、転移曲線をブロードにする効果をもっていた。

4. 最後 に

今回調べた範囲内では、抗生物質はさまざまに相転移の過剰熱容量曲線に変化を与えたが、転移のエントルピー(吸熱量)にはほとんど変化を与えなかった。同様な結果は他の抗生物質とDPPCにおいても報告されている^{16, 17)}。

実際の生体膜の複雑さは、単純な人工膜モデルでの研究との比較を困難なものにしているのは事実である。しかしながら、少量のカルジオリピンやコレステロールが存在するDPPCやDPPGの二重層に組み込まれているような少しでも生体膜に近い組成の人工膜モデルに対し、アドリアマイシンとAD32の異なった効果は保持されること、またAD32がアドリアマイシンよりも効果が大きいことなどが、その後の実験によって明らかになった¹⁸⁾。これらは今回の結果と一致するものである。

現在のところ、抗生物質による脂質二重層の流動化の効果が腫瘍細胞や心臓毒性に対する効果とどの程度相関性があるのかまだよくわかっていない。しかしながら、AD32のようにDNAに対してはほとんど親和性を示さないが、膜構造には影響を及ぼし強い抗腫瘍性を示す抗生物質が存在するという事実は、DNAに対する親和性

だけではなく膜との相互作用が抗生物質の抗腫瘍性にとって重要であることを示している。そして抗生物質の構造と脂質二重層の組成の両方が、これら二成分の相互作用を大きく左右することが今回の研究により明らかである。抗生物質とモデル膜または生体膜との相互作用を詳細に知ることは、癌のより有効な化学療法や薬剤の開発につながると考えられる。

文 献

- 1) A. DiMarco, F. Arcamone and F. Zunino: Antibiotics III. ed. J. W. Corcoran and F. E. Hahn, Springer, Berlin, pp.101 (1975). (a review).
- 2) M. Israel, E. J. Modest and E. Frei, III, *Cancer Res.* **35**, 1365 (1975).
- 3) T. R. Tritton and J. A. Hickman, in Chemotherapy (F. M. Muggia, ed.) vol.2, pp.81, Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands (1985).
- 4) E. Goormaghtigh and J. M. Ruyschaert, *Biochim. Biophys. Acta* **779**, 271 (1984).
- 5) 高橋克忠, 熱測定 **5**, 34 (1978).
- 6) P. P. Constantinides, N. Inouchi, T. R. Tritton, A. C. Sartorelli and J. M. Sturtevant, *J. Biol. Chem.* **261**, 10196 (1986).
- 7) 深田はるみ, 高橋克忠, 熱測定 **4**, 117 (1977).
- 8) P. P. Constantinides and T. R. Tritton, 私信.
- 9) R. Goldman, T. Facchinetti, D. Bach, A. Raz and M. Shinitzky, *Biochim. Biophys. Acta* **512**, 254 (1978).
- 10) J. M. Sturtevant, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 1398 (1984).
- 11) T. J. McIntosh, R. V. McDaniel and S. A. Simon, *Biochim. Biophys. Acta* **731**, 109 (1983).
- 12) B. Kursh, H. Lüllmann and K. Mohr, *Biochem. Pharmacol.* **32**, 2589 (1983).
- 13) B. R. Cater and K. Mohr, *Biochim. Biophys. Acta* **814**, 156 (1974).
- 14) E. P. Bruggemann and D. L. Melchior, *J. Biol. Chem.* **258**, 8298 (1983).
- 15) E. J. Findlay and P. G. Barton, *Biochemistry* **17**, 2400 (1978).
- 16) B. R. Cater, D. Chapman, S. M. Hawes and J. Saville, *Biochim. Biophys. Acta* **363**, 54 (1974).
- 17) J. Fenzel, K. Arnold and P. Nuhn, *Biochim. Biophys. Acta* **507**, 185 (1978).
- 18) P. P. Constantinides, N. Inouchi, A. C. Sartorelli and J. M. Sturtevant, *Biochemistry* in press.