

解 説

NMR による薬物の膜輸送： リン脂質膜内の薬物の拡散， 膜への結合と解離，細胞膜透過

岡村 恵美子

姫路獨協大学薬学部

(受取日：2022 年 1 月 28 日，受理日：2022 年 2 月 19 日)

Drug Delivery from Water to Membrane by NMR: Diffusion, Membrane Binding and Dissociation, Thermodynamic Stability, and Cell Membrane Permeability

Emiko Okamura

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Himeji Dokkyo University, Japan

(Received Jan. 28, 2022; Accepted Feb. 19, 2022)

Drug delivery from water to lipid bilayer membranes is crucial as a primary step of bioactivities in the cell. To gain insight into molecular mechanisms of drug deliveries, we have developed the method to monitor dynamic properties of drugs and lipid components in membranes, by applying high-resolution solution NMR combined with the pulsed-field-gradient (PFG) technique in a noninvasive manner. The PFG method unveiled the bound component after the preferential decay of the free component at the high field gradient, where the chemical shift difference between these components was not enough to distinguish from each other. Using phospholipid vesicles as model cell membranes, we quantified the diffusivity, the kinetics of membrane binding, and thermodynamic stability of small-sized drugs in relation to the temperature. Cell membrane permeability was also discussed by real-time in-cell NMR spectroscopy in combination with isothermal titration calorimetry of the model system. Finally, the dynamical features in lipid membranes, as platform of drug transport, were characterized by temperature dependence of NMR nuclear overhauser effect (NOE) in cell-sized giant vesicles, to demonstrate large fluctuation of lipids in the vertical direction to the membrane surface related to drug delivery phenomena.

Keywords: NMR, drug delivery, thermodynamic stability, cell-penetrating peptide, ITC.

1. はじめに

薬物の膜輸送機構を明らかにし、輸送の過程を制御するためには、膜を構成するさまざまな分子や膜のなかの薬物の「動き」を正しく捉え、理解することが重要である。分子の動きは、さまざまな方法を用いて知ることができるが、このうち核磁気共鳴法 (NMR) は、原子・分子のミクロな情報を得る有効な手段で、1) 調べたい原子サイトを選択的に識別できる、2) ピコ秒から秒までの幅広い時間スケールの動きに関する情報が得られる、3) 試料をそのままの状態 (非破壊的に) 測定できるなど、生きたままの分子の情報をそのまま取りだせる特徴をもつ優れた計測法である。従来 NMR 法が不得手としてきた感度についても、現在で

は、装置の進歩により、核種をエンリッチしなくとも、数十 μM 、場合によってはそれ以下の濃度の定量的な測定が可能となるまでに感度が向上した。このような状況のなかで、NMR を用いて膜のなかの分子のさまざまな動きを探ろうという試みが、さかんになりつつある。

ここでは分子の「動き」に注目して、低分子薬物を例に、膜のなかの薬物の拡散、膜への薬物の結合と膜からの解離 (Fig.1) が温度とどのように関わっているかを考えてみたい。また、薬物の動きに対応する「結合と解離の速度定数」を用いて、膜への薬物の結合量や膜内における熱力学的安定性を知ることができるが、その具体例についても紹介する。最後に、生きた細胞への膜透過ペプチドの輸送機構を明らかにするために、NMR と ITC を併用して行った筆者らの解析例について、簡単に紹介したい。

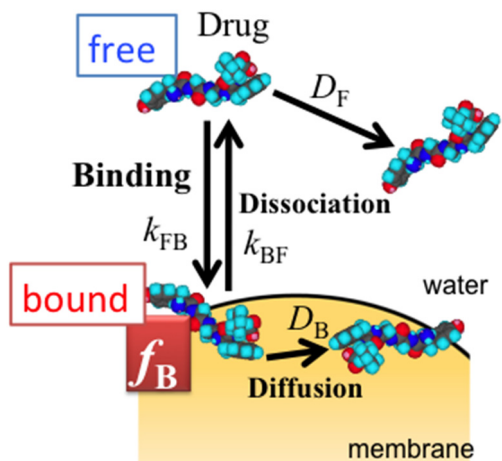


Fig.1 Dynamic model of the drug delivery from water to lipid membrane.³⁾ A part of the drug is bound to the membrane (the fraction, f_B), moves within the membrane (diffusion), and/or dissociates from the membrane. Here D_F and D_B are the diffusion coefficients of drugs in bulk water and the membrane. k_{FB} and k_{BF} are the rate constants of binding and dissociation, respectively. (Color online).

2. 膜のなかの薬物の拡散

膜のなかで薬物はどのように拡散していくのであろうか。膜のなかの拡散は，水中とどのように異なるのであろうか。筆者らは，まず最初に，抗がん剤として広く用いられている5-フルオロウラシル (5FU, **Fig.2**) をモデル薬物に採用して，NMRによる膜のなかの薬物の拡散の解析を試みた。その結果，NMRとパルス磁場勾配スピネコー (PFG) 法²⁾を組み合わせることにより，膜に結合した薬物 (bound) と解離している薬物 (free) を *in situ* で同時に定量し，薬物の結合量や膜のなかの拡散運動を明らかにすることができた。⁴⁾ここでは，生体膜のモデルとして，卵黄ホスファチジルコリン (EPC) の一枚膜ベシクル (Large Unilamellar Vesicle (LUV), 直径 100 nm) を用い，測定温度は，膜が液晶状態にある 293~313 K とした。薬物がフッ素原子を含むため，必要に応じて ^{19}F NMR を使用した。 ^{19}F 原子核は ^1H に近い NMR 感度を有すること，天然の膜中には存在しないため，膜のなかの薬物を選択的に識別可能な点で有利である。

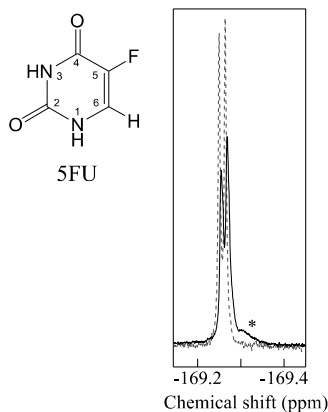


Fig.2 Molecular structure of 5-fluorouracil (5FU) and ^{19}F NMR spectra of 5FU in the presence (solid line) and absence (dashed line) of EPC LUV. Asterisk shows a new peak that appears in the presence of the membrane. (Reprinted with permission from Ref.4. Copyright 2008 AIP Publishing LLC).

最初に，5FUの水溶液 (濃度 2-30 mM) にベシクル (EPC 濃度 40-50 mM) を加え，NMR 計測を行った。⁴⁾ **Fig.2** に 5FU の ^{19}F NMR スペクトルを示す。水溶液中の 5FU のシグナルは，シャープな doublet として観測される (破線)。5FU の 5 位のフッ素と 6 位の水素原子核の間のスピン-スピンカップリング (J-coupling) によるためである。一方，ベシクルが存在すると，**Fig.2** の実線のように，先に述べた doublet に加えて，新しくブロードな成分 (図中の*) が現れる。新しく観測される成分 (*) は，膜に結合した 5FU であると予想される。シグナルの帰属を確かめるために，PFG 測定を行った。膜に結合した 5FU は膜中で運動が制限されるために PFG シグナルの減衰は遅い。一方，free の 5FU は運動が束縛されないために，バルク中で速く拡散する。このために，PFG シグナルは磁場勾配強度の増加にともなって free の成分が優先的に減衰するはずである。実際，5FU の PFG ^{19}F NMR シグナルは，**Fig.3** に示すように，磁場勾配強度 g が増加するに伴ってシャープな doublet が急激に減衰し，ブロードな成分が残った。 ^1H NMR においても同様であった。このことから **Fig.2** の ^{19}F NMR スペクトルにおいて新たに出現したブロードな成分が膜に結合した 5FU, doublet が free の 5FU であることが確認された。⁴⁾

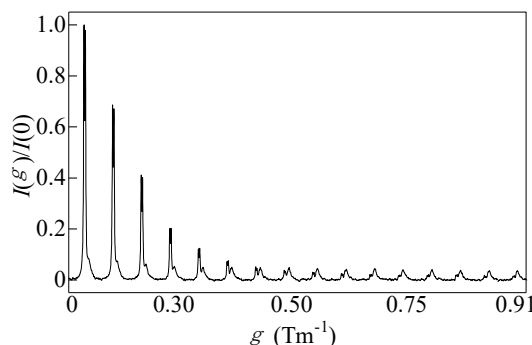


Fig.3 Attenuation of ^{19}F NMR signals of 5FU in the presence of LUV under the magnetic FG (g) of 0.05, 0.15, 0.225, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50, 0.55, 0.60, 0.65, 0.70, 0.75, 0.80, 0.85, and 0.91 T/m (from left to right). Here the rectangular FG pulses were applied with a time interval (Δ_{diff}) of 100 ms, with the gradient pulse width (δ) of 2 ms. (Reprinted with permission from Ref.4. Copyright 2008 AIP Publishing LLC.)

このように，運動性の違いを利用して，膜に結合した 5FU と free の 5FU を識別することができた。そこで，PFG NMR 測定から得られたシグナル強度 I に対して，Stejskal-Tanner の関係式⁵⁾

$$\ln \frac{I(g)}{I(0)} = -Dm^2 \left(\Delta_{\text{diff}} - \frac{\delta}{3} \right) \quad (1)$$

から，膜に結合した 5FU, free の 5FU の拡散係数をそれぞれ算出した。ここで， g は磁場勾配強度， D は拡散係数， Δ_{diff} は拡散時間， $m = \delta \gamma g$ であり， γ は核磁気回転比， δ はパルス幅である。膜に結合した 5FU の拡散係数は 303 K において $0.1 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ であり，free のときの値 $9.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ に比べて 2 桁近く小さいことが分かる。さらに，膜に結合した 5FU の拡散係数は，PFG ^1H NMR 測定によって得られた膜脂質分子の拡散係数 ($0.1 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) と非常に近い。このことは，膜中の 5FU が，膜分子の動き (流動性) に支配されながら膜内を拡散していることを示している (**Fig.4**)。一方，高温 (0.0032 K^{-1}) では，5FU の運動状態は膜分子の動きにはあまり支配されず，脂質分子よりも大きな拡散係数を示すことが明らかとなった。⁴⁾

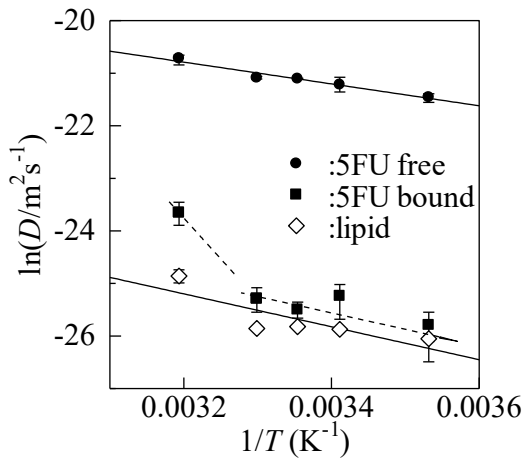


Fig.4 Temperature dependence of the diffusion coefficients of membrane-bound and free 5FU, together with the mobility of the membrane lipid. Note that the dependence of the bound 5FU diffusion is deviated from the Arrhenius type at 313 K. For free 5FU and the lipid, the temperature dependences of the diffusion are of the Arrhenius type with activation energies of 21 (free 5FU) and 26 kJ/mol (lipid), respectively. (Reprinted with permission from Ref.4. Copyright 2008 AIP Publishing LLC.)

3. 薬物と膜との結合・解離のキネティクス

膜に対する薬物の結合と解離 (Fig.1) は、拡散とともに、膜輸送を支配する重要なプロセスである。そこで、筆者らは、5FUの膜への結合、解離について NMR による研究を行い、結合・解離速度を *in situ* で定量化することに成功した。⁶⁾

すでに前項 2 で述べたように、5FU では、膜に結合した (bound) 成分と free の成分は磁場勾配下で区別できる。このような場合、高分解能溶液 NMR 測定と PFG 法を組み合わせた解析が有効である。そこで、筆者らは、薬物の膜への結合・解離速度を明らかにするために、bound と free の状態間の交換を考慮した Bloch 方程式の解析解⁷⁾ による解析を行った。⁶⁾ Bound および free の状態のシグナル強度 I_B および I_F はそれぞれ

$$I_B(m) = \left\{ \frac{I_{B0}}{2} - \frac{\lambda I_{B0} - k_{FB} I_{F0}}{2\Delta} \right\} \exp\{(-\sigma + \Delta)\tau\} + \left\{ \frac{I_{B0}}{2} + \frac{\lambda I_{B0} - k_{FB} I_{F0}}{2\Delta} \right\} \exp\{(-\sigma - \Delta)\tau\} \quad (2)$$

$$I_F(m) = \left\{ \frac{I_{F0}}{2} + \frac{\lambda I_{F0} + k_{BF} I_{B0}}{2\Delta} \right\} \exp\{(-\sigma + \Delta)\tau\} + \left\{ \frac{I_{F0}}{2} - \frac{\lambda I_{F0} + k_{BF} I_{B0}}{2\Delta} \right\} \exp\{(-\sigma - \Delta)\tau\} \quad (3)$$

である。ここで、 k_{FB} , k_{BF} は結合・解離の速度定数、 $\sigma = (k_{BF} + k_{FB} + D_B m^2 + D_F m^2)/2$, $\lambda = (k_{BF} - k_{FB} + D_B m^2 - D_F m^2)/2$, $\tau = \Delta_{diff} - \delta/3$, および $\Delta = \sqrt{\lambda^2 + k_{BF} k_{FB}}$ である。また D_B および D_F はそれぞれ bound および free の状態の 5FU の拡散係数である。式(2)および(3)による解析の妥当性を確かめるために、bound および free の実測のシグナル強度に両式をフィッティングさせた。 k_{FB} と k_{BF} をフィッティング・パラメータとし、 D_B と D_F は式(1)を用いて得ら

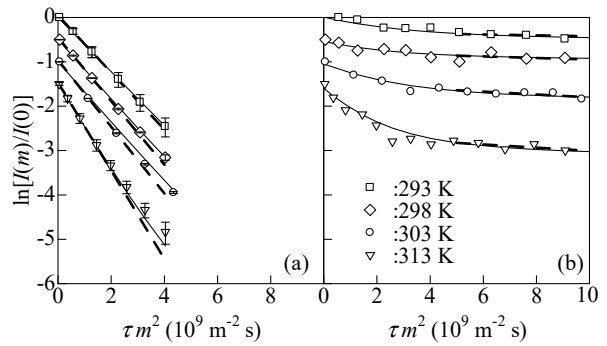


Fig.5 Signal attenuation of (a) free and (b) bound components of 5FU at 293 (□), 298 (◇), 303 (○), and 313 K (▽). The symbols represent the experimental values and the solid lines are obtained by fitting Eqs. (2) and (3) to the signal intensity. The results of $T = 298, 303,$ and 313 K are shifted to negative value by $-0.5, -1.0,$ and $-1.5,$ respectively. The symbols in (a) indicate the average of the doublet peak intensities, and the error bar represents the deviation of the observed intensity from the average value. (Reprinted with permission from Ref.6. Copyright 2009 Elsevier.)

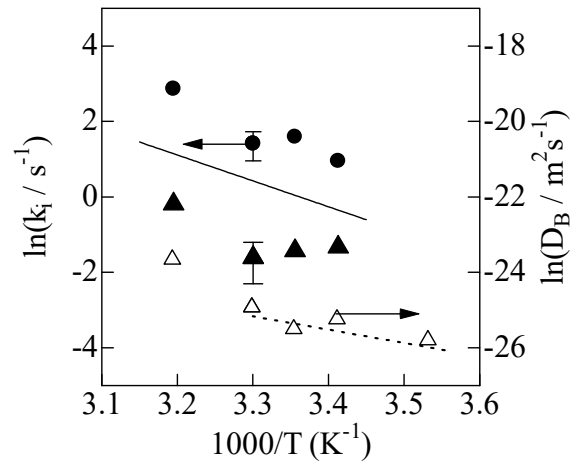


Fig.6 Arrhenius plots of the exchange rates k_{BF} (●) and k_{FB} (▲) of 5FU. The averaged activation energy of k_{BF} and k_{FB} is 57 kJ/mol (shown as solid line). The temperature dependence of the diffusion coefficient D_B is also plotted as △. The activation energy of D_B is 26 kJ/mol (dashed line)⁴⁾. (Reprinted with permission from Ref.6. Copyright 2009 Elsevier.)

れた値に固定した。結果は、Fig.5 に示すように、両式は、いずれの温度においても実測値をよく再現した。

そこで、式(2), (3)を用いて結合・解離の速度定数 k_{FB} と k_{BF} を算出した。5FU の k_{FB} , k_{BF} は、濃度 10 mM では、脂質濃度 40 mM の膜に対して、303 K でそれぞれ 0.2 および 4.1 s^{-1} となった。したがって半減期はそれぞれ 3.5 および 0.17 s であり、5FU の膜への結合と解離は、NMR 測定の時定数 (サブ秒~秒) と同程度の slow exchange であることがわかった。また、 k_{FB} と k_{BF} の温度依存性は、Fig.6 のように、アレニウス型を示した。傾きから求めた活性化エネルギーは、57 $kJ\ mol^{-1}$ であった。膜内での拡散運動については、Fig.4 における D_B のアレニウスプロットから、活性化エネルギーが 26 $kJ\ mol^{-1}$ となることがわかっている。⁴⁾ これらの比較から、5FU の膜法線方向の運動は、側方拡散に比べて制限されていることが明らかとなった。⁶⁾

4. 膜への薬物の結合量と膜内での熱力学的安定性

薬物の膜への結合量 f_B は、実測で得られた k_{FB} と k_{BF} から $f_B = k_{FB}/(k_{BF} + k_{FB})$ により評価することができる。そこで、膜に対する 5FU の結合量を *in situ* で定量した。温度 303 K において、5FU は、濃度が 2-30 mM の範囲で全体の約 10% が膜に結合していた (Fig.7(A))。4) 得られた結合量からバルクと膜中における自由エネルギー差 ΔG を次のように評価した。 ΔG は式(4)で与えられる。4)

$$\Delta G = -kT \ln \frac{c_{lipid}}{c_{bulk}} = -kT \ln \frac{V_{lipid}}{V_{bulk}} \frac{f_B}{1-f_B} \quad (4)$$

ここで、 k はボルツマン定数、 T は絶対温度、 f_B は結合した 5FU の割合、 c_{lipid} と c_{bulk} は膜中および水中 (バルク中) の 5FU の濃度、 V_{lipid} と V_{bulk} は膜とバルクがそれぞれ占める体積である。X 線を用いた研究で、リン脂質 EPC 1 分子が占める体積は 303 K において $1.26 \times 10^{-27} \text{ m}^3$ と見積もられている。8) 一方、EPC の濃度が 45 mM のとき、 V_{lipid} は体積 1 L あたり 34 cm^3 と求められる。したがって、残り 966 cm^3 が V_{bulk} であり、両者の比は $V_{bulk}/V_{lipid} \approx 28$ となる。

式(4)を用いて ΔG を評価した結果、5FU の場合 ΔG は 3 kJ mol^{-1} であり、303 K における熱ゆらぎ 2.5 kJ mol^{-1} とほぼ同程度であった。4) このことから、5FU は膜への結合がそれほど優位でないことがわかる。さらに、温度を 280-310 K の間で変化させても、結合の割合にそれほど大きな差は認められなかった (Fig.7(B))。4) 上記の温度範囲で脂質が液晶状態にあることから、二分子膜への 5FU の結合量にそれほど変化が見られなかったものと考えられる。

これに対して、疎水性の高い化合物では、膜内における熱力学的安定性が顕著に異なる。例えば、ビスフェノール A のフッ素誘導体、fluorinated bisphenol A (FBPA; $(\text{CF}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$) では ΔG が 303 K において約 20 kJ mol^{-1} に及ぶことが筆者らの NMR 研究で分かっており、9) 疎水性の高い化合物で膜との親和性が高いことが明らかになっている。5FU は核酸塩基であるウラシルの誘導体で親水的であるのに対し、FBPA は分子内にベンゼン環を 2 つ有する分子であり、水への溶解度も、室温で約 $60 \mu\text{M}$ と非常に低い。このような性質の違いに伴い、膜への親和性・熱力学的安定性が著しく変化するものと考えられる。

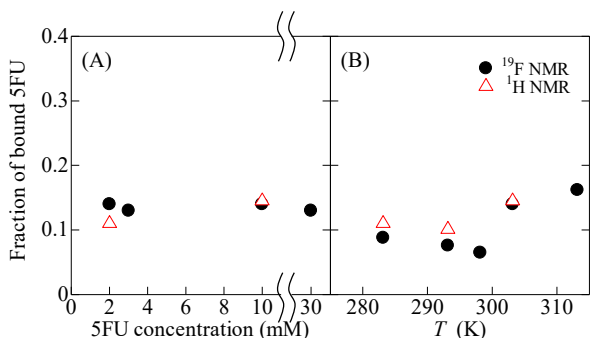


Fig.7 Dependence of (A) the 5FU concentration and (B) the temperature on the membrane binding. In (A), the fraction of bound 5FU at 303 K is plotted against the 5FU concentration. In (B), the temperature dependence of the binding is shown at the 5FU concentration of 10 mM. Circles and triangles designate the results from the ^{19}F and ^1H NMR analyses, respectively. (Reprinted with permission from Ref.4. Copyright 2008 AIP Publishing LLC.)

5. 生きた細胞への膜透過ペプチドの輸送機構

オクタアルギニンやペネトラチン、HIV-TAT ペプチドに代表される「膜透過ペプチド」は、タンパク質、核酸、遺伝子など、それ自身では細胞に入らないバイオ医薬品を効率的に細胞内に導入するためのツールとして期待される「くすりの運び屋ペプチド」である。筆者らは、NMR を生きた細胞系に適用して、膜透過ペプチドがヒトの細胞にどのように輸送されるのかを明らかにするための研究を行っている。そのために、輸送の過程を *in cell* NMR を用いて、分単位の時分解でリアルタイム計測する方法を開発した。Table 1 に代表的な膜透過ペプチドのアミノ酸配列を示す。表からも分かる通り、膜透過ペプチドにはアルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸が多く含まれている。筆者らは、このような正電荷に富むペプチドが、如何にして疎水性の細胞膜を通過し、細胞質内に移行するかに注目した。

膜透過ペプチドの細胞への輸送経路として、「エンドサイトーシス」と膜輸送タンパク質の関与しない「物理的な膜透過」が存在することが知られている。10,11) 生理的温度である 37°C ($= 310 \text{ K}$) では膜輸送タンパク質の働きが活発で、エンドサイトーシスを抜きにしてペプチドの膜透過機構を語ることはできない。しかしながら、低温 (例えば 4°C ($= 277 \text{ K}$)) では、タンパク質の働きが抑えられるために、膜輸送タンパク質が関与しない「物理的な膜透過」を選択的に観測することができる。エンドサイトーシスによる輸送過程では、ペプチドが最終的に細胞内のリソソーム (lysosome) で分解されてしまうため、そのような不都合が起こらない「物理的な膜透過経路」が重要となる。そこで、筆者らは、N 末端を 4- CF_3 -フェニルアラニンでフッ素標識したオクタアルギニンをヒトの生細胞に加え、その直後から ^{19}F NMR 測定を開始した。12) 温度は 4°C に固定し、ペプチドのみを選択的に識別しながら、ペプチドの物理的な膜透過機構に着目して解析を行なった。

Table 1 Amino acid sequences of membrane-permeable peptides.

Peptide	Amino acid sequence
Octaarginine	RRRRRRRR
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK
HIV-TAT	GRKKRRQRRRPPQ

まず、 37°C と 4°C において、細胞に加えたときのペプチドの NMR シグナルがどのように変化するかを調べた。各温度におけるペプチドの ^{19}F NMR シグナルの時間変化を Fig.8 に示す。 4°C (Fig.8(a)) の場合と比較すると、 37°C (Fig.8(b)) では、細胞と混合して約 10 分後に新たなピーク (-61.84 ppm) が認められ、時間とともに次第に増加することが分かった。これに伴い、ペプチドの元のシグナル (-61.66 ppm) は徐々に弱くなった。このようなシグナルの変化が 4°C (Fig.8(a)) では見られなかったこと、温度を 37°C に上げてても、細胞と混合しなければ起こらないことから、 37°C で観測された新たなシグナルは、ペプチドの分解など、エンドサイトーシスによる経路と関係する可能性が高いと考えられる。詳細は検討の余地があるが、混合初期 (4 分後) においてシグナルがかなりブロードになっており、この時点における上記経路の影響が示唆される。これに対して、 4°C では細胞と混合後も新たなピークが出現することはなかった。低温ではエンドサイトーシスによる輸送経路を考慮する必要がなく、物理的な膜透過が優位に起こると予想される。

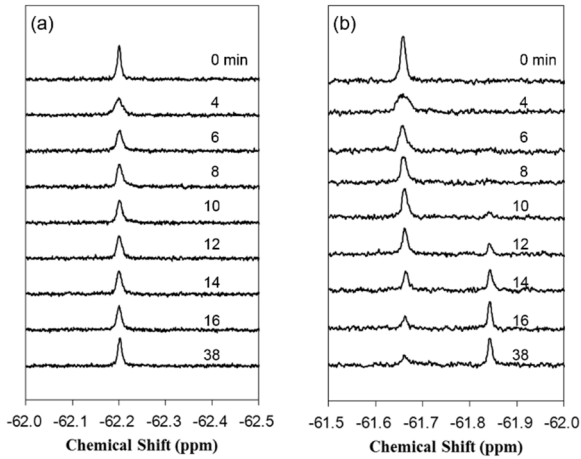


Fig.8 Real time ^{19}F NMR spectra of ^{19}F -octaarginine (^{9}F -R8) after addition to cells at (a) 4 and (b) 37 °C.¹²⁾ The number attached to each spectrum indicates the passage of time before (0 min) and after the addition to cells (in min unit). At 37 °C (b), a new peak is observed at -61.84 ppm after 10 min, and gradually increased with time. The increase of the peak at -61.84 ppm is coupled with a gradual decrease in the original signal of ^{19}F -R8 at -61.66 ppm. Notice that such kind of signal change is not observed at 4 °C (a).

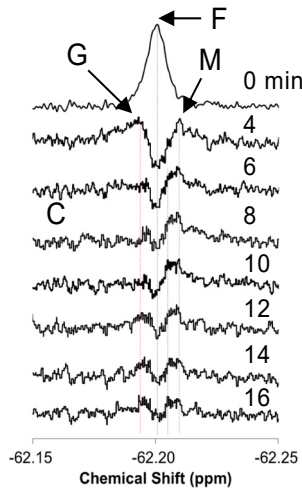


Fig.9 ^{19}F NMR spectrum of ^{19}F -R8 in buffer (0 min), and difference spectra of the real-time in-cell ^{19}F NMR of ^{19}F -R8 4, 6, 8, 10, 12, 14 and 16 min after the addition to cells at 4 °C.¹²⁾

このように、温度を変化させることで、エンドサイトーシスによる輸送と、膜輸送タンパク質が関与しないエネルギー非依的な物理的膜透過の経路を区別することができたことから、次に、タンパク質が関与しない物理的膜透過がどのようなプロセスを経て進行するのか、そのメカニズムについて検討した。4 °C で ^{19}F -オクタアルギニンを細胞に加え、その直後から ^{19}F NMR スペクトルの変化を観測すると、**Fig.9** に示すように、シグナルが経時的に変化し、フリーの成分 (**F**) の他に新たに 3 種のコンポーネント (**G**, **M**, **C**) が順次現れることを確認した。これらは、それぞれ、「**G**; 細胞表面に存在する糖鎖、グリコサミノグリカン (**GAG**) と結合したオクタアルギニン」、「**M**; 細胞膜中のオクタアルギニン」、「**C**; 膜を通過して細胞質に到達したオクタアルギニン」と帰属することができた。この帰属が妥当であることを確認するために、それぞれ対応するモデル系について NMR 計測、熱測定 (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) を行い、最後に細胞分画を実施した。

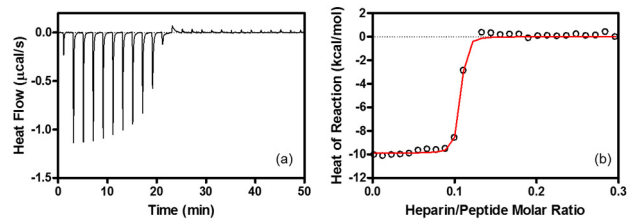


Fig.10 ITC associated with the interaction between octaarginine and heparin.¹²⁾ (a) ITC for heparin (100 μM) injection into octaarginine solution (45 μM) at 25 °C. Each peak in heat flow chart corresponds to the injection of 1.0 μL aliquots of heparin solution. (b) Heats of reaction (integrated from the calorimetric trace, and corrected for the dilution control) plotted as a function of heparin/peptide molar ratio. The solid line is the best fit to the experimental data, from which the thermodynamic parameters are determined by using the single site binding model.

例えば、細胞表面糖鎖 (**GAG**) のモデルとしてヘパリンがよく用いられるが、これをオクタアルギニンに加えると、**Fig.9** の **G** と同じように、オクタアルギニンの NMR シグナルが低磁場側 (左側) に移動する。¹²⁾ さらに、ITC (**Fig.10**) を用いて、ヘパリンに対するオクタアルギニンの結合の親和性と熱力学的安定性について評価したところ、両者の会合定数は 25 °C で $1.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 、結合の自由エネルギーは $-10.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ と見積もることができた。¹²⁾ また、結合に伴うエンタルピー変化 ΔH は $-9.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ であった。¹²⁾ これらの結果は、正電荷を有するオクタアルギニンが負に帯電したヘパリン中の硫酸基あるいはカルボキシ基に静電的に結合することによりエネルギー的に安定化されることを示しており、オクタアルギニンが負に帯電した細胞表面の糖鎖に対しても高い親和性を有することが明らかとなった。

一方、細胞膜のモデルとしてリン脂質ベシクルを用いて NMR と ITC 計測を行ったところ、NMR では、オクタアルギニンのシグナルが **Fig.9** の **M** と同じように高磁場側 (右側) に移動した。また、オクタアルギニンをベシクルに加えながら熱の出入りを計測した結果、両者の会合定数は 25 °C で $1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、結合の自由エネルギーは $-8.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ となり、オクタアルギニンがリン脂質膜に対しても親和性を有することも明らかとなった。

さらに、リアルタイム NMR 計測後に細胞の可溶化と遠心分離操作を組み合わせた細胞分画を行なって、得られた各細胞画分に、オクタアルギニンが最終的にどれだけ分布するかを調べた。その結果、細胞内のサイトゾル (細胞質) 画分からもオクタアルギニンの NMR シグナルが認められ、オクタアルギニンが実際に細胞膜を通過して細胞内部に侵入することを確かめることができた。¹²⁾ **Fig.9** において、成分 **C** が細胞膜中の成分 **M** よりも低磁場側 (左側) に移動し、フリーの成分 **F** に近づいていることから、**C** がオクタアルギニンのサイトゾル成分であると言える。以上の結果から、膜輸送タンパク質が関与しない“物理的な”膜透過経路について、**Fig.11** に示すように、正電荷を有するアルギニンペプチドが (i) 負に帯電した細胞表面糖鎖・グリコサミノグリカン (**GAG**) にトラップされた後、(ii) 疎水性の細胞膜を透過し、(iii) 細胞質内に輸送されるという新しいタイプの輸送プロセスを明らかにした。¹²⁾ (i) でアルギニンの正電荷が糖鎖のもつ負電荷によって細胞表面で中和される事になる。ところが、電荷をもたないペプチド-GAG complex が水中で存在するのは、エネルギー的に不利である。したがって、このような水中における不利な状況を回避するために、電荷が中和されたオクタアルギニンが疎水性の膜内に取り込まれ、膜透過を促進するものと考えられる。

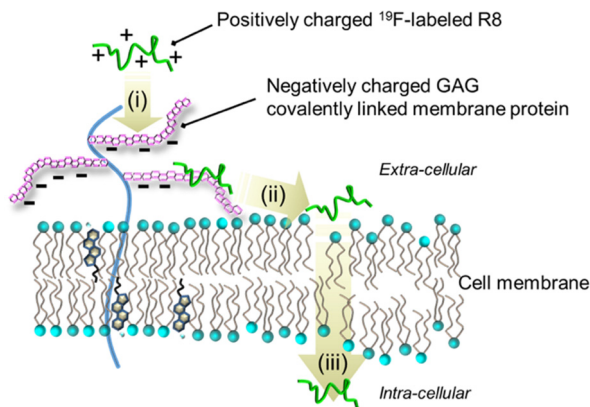


Fig.11 A plausible mechanism for non-endocytic, energy-independent translocation of ^{19}F -octaarginine into cells.¹²⁾ The mechanism involves (i) binding of octaarginine to GAG at the cell surface, followed by (ii) the transfer to the cell membrane and (iii) the entry into cytosol. (Color online).

6. 細胞サイズベシクル中の熱揺らぎ

薬物の膜輸送機構を明らかにするために、そして膜輸送を制御するためには、薬物の動きのみならず、薬物の拡散や膜透過の「場」となる膜の中でリン脂質分子を始めとする膜構成分子がどのような動きをしているかを捉えることも重要である。筆者らは、特に生体膜中の分子の“熱的な揺らぎ”に焦点を当てて、実際の細胞とほぼ同じ大きさの直径 10~20 μm の巨大ベシクル膜中でリン脂質がどのような動きをするのかを明らかにするために、溶液NMRを用いた解析を行い、膜のモデルとして汎用されるナノサイズのベシクル (直径 100~800 nm) と比較した。¹³⁾

まず、細胞サイズベシクルは、卵黄ホスファチジルコリン (EPC) と卵黄ホスファチジルグリセロール (EPG) (モル比4:1) を構成成分とする薄膜を作成後、310 Kで静置水和法により調製した。比較のために、直径 100, 400, 800 nm の一枚膜ベシクルを通常のエクストルージョン法により調製した。**Fig.12(A), (B)**は筆者らが調製した細胞サイズベシクルの位相差顕微鏡画像及び蛍光顕微鏡像である。平均粒子径 (直径) $15 \pm 7 \mu\text{m}$ のまさに細胞サイズの小胞が高濃度 (~1 mM) で安定に分散している様子が見て取れる。

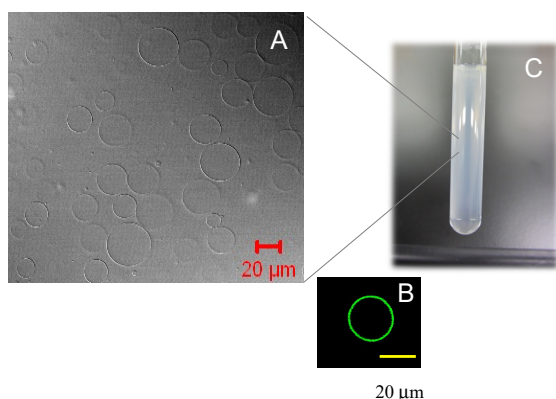


Fig.12 Differential interference image (A) and fluorescent microscopic image (B) of cell-sized vesicles composed of 80 % EPC, 20 % EPG, and small amount of CF-DOPE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(carboxyfluorescein)) prepared for the NMR study (C). The bars in the images correspond to 20 μm . (Color online).

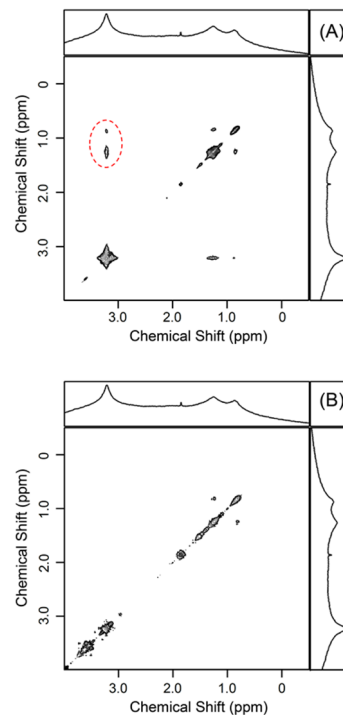


Fig.13 ^1H - ^1H NOESY (A) and ^1H - ^1H COSY (B) spectra of cell-sized vesicle at 303 K. The circle shows the correlation peak between the protons of hydrophilic choline methyl and hydrophobic chain methylene and methyl. (Reprinted with permission from Ref.13. Copyright 2013 Elsevier.)

このような細胞サイズベシクルを水中に分散させた状態でNMRスペクトルを観測し、ナノサイズのベシクルのスペクトルと比較した。その結果、リン脂質分子の環境や局所的な運動状態は、曲率の大きなナノサイズのベシクル膜中とほぼ同じであるが、リン脂質分子全体の回転運動 (tumbling) が、細胞サイズベシクル中で遅くなることを見出した。回転運動にもとづく分子回転相関時間 τ_c は、細胞サイズベシクル中でサブ秒~秒と計算され、ナノサイズベシクル中の相関時間 (ピコ秒~ナノ秒) よりもはるかに大きかった。¹³⁾ 一方、NMR 核オーバーハウザー効果 (NOE) を利用すると、特定の原子核間の平均的な距離情報(r)が得られる。細胞サイズベシクルについて2次元 ^1H - ^1H NOESY測定を行った結果、**Fig.13(A)**のように、3.2 ppm付近のEPCの頭部親水基と1.0 ppm前後の膜内部・疎水鎖部分 (メチレン鎖や末端メチル基) の間の相互作用を示す相関がスペクトル上で観測された。分子内結合を介した相互作用を示すCOSYスペクトルではこの位置に相関が認められなかったことから (**Fig.13(B)**), EPCの頭部親水基と疎水鎖部分が分子内では離れているにもかかわらず、膜内で垂直方向に上下運動することにより (突出運動 Protrusion) 距離的に近づく場合があることを明らかにした。さらに、リン脂質の頭部親水基と膜内部の疎水鎖部分の平均距離を $\langle r \rangle$ 、先ほどのリン脂質分子の回転の相関時間を τ_c としたとき、 $-(r)^{-6}\tau_c$ に比例するNOE enhancement factor, η に注目してその温度依存性を調べたところ、直径100 nmのナノサイズのベシクルでは温度上昇とともに τ_c が小さくなるため、 η も温度とともにその絶対値が小さくなるが、細胞サイズベシクルでは、温度上昇とともに τ_c が小さくなるにもかかわらず、 η の絶対値は増加することが分かった (**Fig.14**)。この結果は、まさに、温度上昇にもなう τ_c の減少よりも $\langle r \rangle$ の減少が顕著なこと、すなわち、リン脂質の頭部親水基と膜内部の疎水鎖

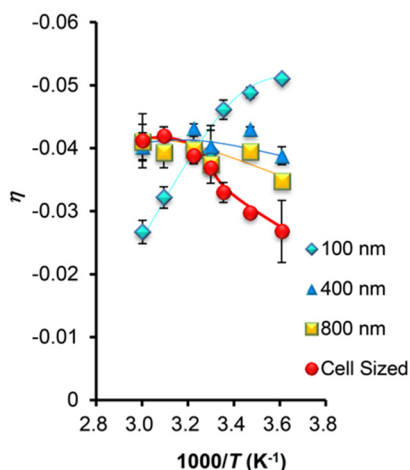


Fig.14 The NOE enhancement factor, η , between the hydrophilic headgroup choline and hydrophobic alkyl chains of various sized vesicles plotted as a function of the reciprocal of the thermodynamic temperature. (Reprinted with permission from Ref.13. Copyright 2013 Elsevier.) (Color online).

がかなり接近することを示す結果で、細胞サイズベシクルのような曲率が小さい膜中においても、リン脂質は、なお、膜面に垂直に揺らいでおり、膜表面にかなり凹凸が生じていることが明らかになった。NOE enhancement factor, η と回転の相関時間 τ_c から親水基・疎水基間の平均距離 (r) を求めると、約 0.4 nm となり、このことから、細胞サイズベシクルの中で、リン脂質が膜面の垂直方向に大きく揺らいでいる様子を裏付けることができた。¹³⁾

このようなリン脂質の突出運動は、水中から膜中への物質の取り込みや膜透過のメカニズムと密接に関係するものと考えられ、この意味で非常に重要である。実際、細胞サイズのベシクル膜は通過できても、ナノサイズのベシクルを通過できない例も報告されており、¹⁴⁾ リン脂質分子の動きが膜透過に直接的・間接的に影響を及ぼしている可能性を示唆している。

7. おわりに

筆者らは、膜の構造的なゆらぎや膜輸送などに関連した分子の動きを理解するために、膜のなかの分子の運動を NMR で直接観測する方法を開発した。高分解能 NMR とパルス磁場勾配スピンエコー法を組み合わせることによって、薬物の膜への結合、膜中の拡散、および膜との結合・解離のキネティクスを *in situ* で定量化することができた。系に摂動を与えることなくそのままの状態を捉えることが可能な NMR 測定は、熱揺らぎをともなう膜へのドラッグデリバリー研究に対して有力な手法である。とりわけ、生きた細胞における薬物の膜輸送やその制御機構の解明のため、研究のさらなる展開が待たれるところである。

二分子膜の構造や膜を構成する分子の動きも薬物輸送に密接に関与している。本稿ではリン脂質二分子膜ベシクルを対象とした NMR 研究の一例を紹介したが、筆者らはこのほかにも、FTIR を用いて、リン脂質二分子膜中の分子配向の温度変化を相転移現象と関連づけて明らかにしてきた。紙面の関係で詳細は省略するが、興味のある方は引用文献 15,16 を参照していただきたい。

謝 辞

本稿は、以下の方々との共同研究の成果である。お名前を記して御礼申し上げたい。吉井範行准教授 (姫路獨協大薬, 現・信越化学工業 (株)), 武知 (原矢) 佑樹助教 (姫路獨協大薬, 現・国立衛研), 安岐健三特任助教 (姫路獨協大薬), 通山由美教授 (姫路獨協大薬), 斎藤博幸教授 (京都薬科大学)。また、JSPS 科学研究費補助金 (KAKENHI) 基盤研究, 新学術領域研究「揺らぎが機能を定める生命分子の科学」, 資生堂女性科学者サイエンスグラント, ひょうご科学技術協会研究グラントから助成を受けて実施された。

文 献

- 1) E. Okamura and M. Nakahara, *Liquid Interfaces in Chemical, Biological, and Pharmaceutical Applications* (A.G. Volkov ed), Marcel Dekker, New York, pp.775-805 (2001).
- 2) P. Stilbs, *Prog. NMR Spectrosc.*, **19**, 1-45 (1987).
- 3) E. Okamura, *Journal of the Society of Japanese Women Scientists* **16**, 7-14 (2016).
- 4) E. Okamura and N. Yoshii, *J. Chem. Phys.* **129**, 215102-1~8 (2008).
- 5) E. O. Stejskal and J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.* **42**, 288-292 (1965).
- 6) N. Yoshii and E. Okamura, *Chem. Phys. Lett.* **474**, 357-361 (2009).
- 7) C. S. Johnson Jr., *J. Magn. Reson.* **A102**, 214-218 (1993).
- 8) J. F. Nagle and S. Tristram-Nagle, *Biochim. Biophys. Acta* **1469**, 159-195 (2000).
- 9) N. Yoshii and E. Okamura, *J. Phys. Chem. B* **115**, 11074-11080 (2011).
- 10) A. T. Jones and E. J. Sayers, *J. Control. Release* **161**, 582-591 (2012).
- 11) C. L. Watkins, D. Schmaljohann, S. Futaki, and A. T. Jones, *Biochem. J.* **420**, 179-189 (2009).
- 12) Y. Takechi-Haraya, K. Aki, Y. Tohyama, Y. Harano, T. Kawakami, H. Saito, and E. Okamura, *Pharmaceuticals* **10**, 42 (2017).
- 13) Y. Takechi, H. Saito, and E. Okamura, *Chem. Phys. Lett.* **570**, 136-140 (2013).
- 14) P. E. G. Thorén, D. Persson, E. K. Esbjörner, M. Goksör, P. Lincoln, and B. Nordén, *Biochemistry* **43**, 3471-3489 (2004).
- 15) E. Okamura, J. Umemura, and T. Takenaka, *Biochim. Biophys. Acta* **1025**, 94-98 (1990).
- 16) E. Okamura, J. Umemura, and T. Takenaka, *Vibrational Spectrosc.* **2**, 95-100 (1991).



岡村 恵美子
Emiko Okamura
E-mail: emiko@gm.himeji-du.ac.jp