総説

高圧力下におけるリン脂質二重膜の相挙動

徳島大学工学部生物工学科 金品昌志, 松木 均

High-pressure studies on the bilayer phase transitions of phosphatidylcholines containing linear saturated acyl chains are reviewed. Temperature-pressure phase diagrams of lipid bilayer membranes are shown; the pressure-induced, interdigitated gel phase is found in addition to liquid crystal, ripple gel and lamellar gel phases. The minimum pressure for the interdigitation of lipid bilayers decreases with an increase in acyl chain length in a non-linear manner. Thermodynamic quantities for phase transitions are also discussed.

lipid / bilayer membrane / interdigitation / phase transition / pressure

1. はじめに

リン脂質二重膜の相転移や膜流動性におよぼす圧力効果の研究は、麻酔作用の圧拮抗現象を理解する目的で25年前に開始されたが¹⁾、最近では、さらに食品加工における高圧力殺菌²⁾や深海生物の高圧力環境適応³⁾などを視野に入れた研究へと発展してきている。生体膜中に最も多く分布しているジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) を対象に、ESR、ジラトメトリー、熱測定、蛍光、X線回折、動的光散乱、中性子回折、光透過、NMRなどの方法を駆使し、高圧力下における二重膜の構造と機能に関する情報が収集されてきた⁴⁾。我々はこれまで種々のアシル鎖をもつホスファチジルコリン (PC) 二重膜の高圧力下における相挙動を温度 (T) - 圧力 (P) 相図で示してきた⁵⁾⁻¹¹⁾。ここでは、二重膜の相図と相転移熱力学量のアシル鎖長依存性を示し、圧力によって誘起される二重膜の指組み構造 (interdigitation) について紹介する。以下では、同じ鎖長の2本の飽和アシル鎖をもつリン脂質を、アシル鎖の炭素数を用いて略記する。例えばDPPCを16:0-PCのように表す。

2. 高圧力下におけるPC二重膜の相転移

常圧下における二重膜相転移の観測には示差走査熱量法 (DSC) が最も広く利用されているが、高圧力下での相転移観測に我々は光透過法を用いている。DSCも光透過も同一の相転移温度を検出するので、高圧力下の測定方法として光透過法は十分利用できる。また

指組み構造を観測する場合にはDSCよりもむしろ光透過法が有利であることも判明している¹²⁾。高圧力下で相挙動を知るために、一定温度で加圧による相転移を検出する方法 (barotropic transition) と、一定圧力で昇温による相転移を検出する方法 (thermotropic transition) を併用している。両者による観測は転移の可逆性を見極めるのに有効である。

PCの二重膜で観測される相状態は図1に示すように主に、液晶 (L_α) 相、リップルゲル (P_β') 相、ラメラゲル (L_β') 相および指組みゲル ($L_\beta I$) 相の4種類が知られている。 L_α 相以外はゲル相での多形現象であり、PC二重膜の特徴でもある。PC分子は大きな極性基をもつため、ゲル相の二重膜では鎖が二重膜面に対して垂直に配向すると疎水基同士が十分に接近できない。そこで、約30度傾斜することによって疎水鎖間の安定な距離が保たれており、このことが P_β' 相や $L_\beta I$ 相などの多形の原因となっている。

3. PC二重膜の温度-圧力相図

炭素数13～18の飽和アシル鎖PC二重膜の相図を図2に示す¹¹⁾。 P_β' 相から L_α 相への主転移温度 (T_m) は加圧により上昇する。 L_β' 相から P_β' 相への前転移温度 (T_p) も加圧によりゆるやかな上昇を示している。14:0-PCよりも長鎖の脂質二重膜では高圧領域で P_β' 相と L_β' 相の間に $L_\beta I$ 相が出現し、その領域は高圧力側ほど拡張している。指組み構造を形成するのに必要な圧力はアシル鎖が長くなると低圧側に移行する傾向を示した。相図の上で特に注目すべきは、 L_β' 相と $L_\beta I$ 相の相境界

Phase Behavior of Phospholipid Bilayer Membranes under High Pressure

Shoji KANESHINA and Hitoshi MATSUKI

Department of Biological Science and Technology, Faculty of Engineering, The University of Tokushima

高圧力下におけるリン脂質二重膜の相挙動

図1 ホスファチジルコリン二重膜の構造と相転移の模式図

図2 飽和アシル鎖ホスファチジルコリン二重膜の相図

(a) 13:0-PC, (b) 14:0-PC, (c) 15:0-PC, (d) 16:0-PC, (e) 17:0-PC, (f) 18:0-PC. L_{α} : 液晶相, P_{β}' : リップルゲル相, L_{β}' : ラメラゲル相, $L_{\beta I}$: 指組みゲル相. 相転移: (○) $P_{\beta}' \rightarrow L_{\alpha}$, (△) $L_{\beta}' \rightarrow P_{\beta}'$ あるいは $L_{\beta I} \rightarrow P_{\beta}'$, (□) $L_{\beta}' \rightarrow L_{\beta I}$.

が、まず負の傾きを示し、アシル鎖が長い場合 (17:0-PC や 18:0-PC) には、この負の傾きがさらに高圧力になると正の傾きへと反転していることだ^{5), 11)-13)}。二相平衡の温度と圧力の関係はクラペイロン・クラウジウスの式

$$dT/dP = T\Delta V/\Delta H \quad (1)$$

で記述でき、相境界線の傾き (dT/dP) の正負は相転移エンタルピー (ΔH) と相転移体積 (ΔV) の符号により

決まる。これまでに報告された相図のうちには、 L_{β}' 相と $L_{\beta I}$ 相の相境界の傾きが正となっているものがいくつかある。しかしながら、 L_{β}' 相から $L_{\beta I}$ 相への転移体積は負 (16:0-PC では $-2.6 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$, 18:0-PC では $-3.0 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$)¹⁴⁾ であり、転移エンタルピーは吸熱 ($\Delta H > 0$)¹⁵⁾ であることから dT/dP は負となることが熱力学の要請である。18:0-PC のようにさらに高圧力下で dT/dP が負から正に転ずることは、 L_{β}' 相の圧縮率が $L_{\beta I}$ 相の圧縮率より大きい場合に十分予想される。この場合には、十分

な高圧力になると L_{β}' 相と L_{β} I相のモル体積が逆転し、 ΔV は負から正に転ずることになるであろう。

4. 主転移

アシル鎖はゲル状態ではすべてトランス形でまっすぐに伸びた状態にあるが、 T_m 以上で回転異性体のゴーシュ形が増して鎖はゆらぎ、秩序性の低い膜となる。脂肪酸の融解現象との対比は興味深い。図2から明らかなように、いずれの脂質二分子膜も T_m は100 MPaまではほぼ直線的に上昇し、傾き dT/dP はアシル鎖長に依

存して $0.200 \sim 0.230 \text{ K MPa}^{-1}$ の間で変化した⁷⁾。脂肪酸の融点は炭素数の奇数偶数不連続性が知られているが、リン脂質二重膜の主転移温度については炭素数の奇数偶数不連続性は観測されず、円滑な変化を示した(図3)。 ΔH および ΔV のアシル鎖長依存性は図4に示すように直線とはならず、上に凸のゆるやかな曲線となった。 ΔS の鎖長依存性も同様の傾向を示した。なお、 ΔH の値については文献値との比較も示した¹⁶⁾⁻¹⁹⁾。

MasonとHuang²⁰⁾は相転移熱力学量がアシル鎖長に対して直線とならない理由を次のように考えた。2本のアシル鎖がともに等しい炭素数の飽和炭化水素から成る場合、リン脂質分子特有の分子構造のために、二重膜状態では2本のアシル鎖の末端が同じ位置に並ばない。1位に付いたアシル鎖が2位のそれより炭素1.5個分突出している。また、2本の鎖の付け根では回転の自由度(トランス-ゴーシュ転移)が束縛される。したがって、残りの炭化水素部分の相転移挙動を乱すことになる。彼らは次式で摂動パラメーターを定義した。

$$P = [3.5 / (2N - 5.5)] \times 100 \quad (2)$$

ここで、 N はアシル鎖の炭素数を表す。図5には ΔV と ΔH をパラメーター P の関数として示した。良い直線関係を示している。この結果は炭素数11以下では P_{β}/L_{α} 転移が存在しないことを示唆している。

図3 リン脂質二重膜の主転移温度におよぼすアシル鎖長の影響

図4 (a) 飽和アシル鎖ホスファチジルコリン二重膜の主転移エンタルピーにおよぼすアシル鎖長の影響。(○) 一森ら⁷⁾、(□) MabreyとSturtevant¹⁶⁾、(▼) Stümpelら¹⁷⁾、(△) Lewisら¹⁸⁾、(◇) Linら¹⁹⁾。(b) 飽和アシル鎖ホスファチジルコリン二重膜の主転移体積変化におよぼすアシル鎖長の影響。

図5 飽和アシル鎖ホスファチジルコリン二重膜の主転移体積変化および主転移エンタルピーとMasonとHuang²⁰⁾によって定義された摂動パラメーターの関係。

5. 前転移

L_{β}' 相から P_{β}' 相への前転移は、炭素数 13～18 の PC で観測された。転移温度の圧力依存性、 dT/dP は $0.12 \sim 0.14 \text{ K MPa}^{-1}$ の範囲にあり、相転移熱力学量 (ΔH , ΔS および ΔV) についてはアシル鎖長依存性は現れていない。主転移はアシル鎖のトランス-ゴーシュ転移であるため鎖長依存性が見られたが、前転移ではアシル鎖はトランスジグザグであり、鎖は伸び切った状態のままで親水基部分のパッキングが変化する。アシル鎖が膜面に対して傾斜しているため L_{β}' 相から P_{β}' 相への転移が起こる。したがって、アシル鎖にはほとんど変化がない。 ΔH , ΔS および ΔV の値も主転移に比べて著しく小さい。

6. 指組み構造の形成

PC 二重膜では圧力によって $L_{\beta}I$ 相が誘起される。直接的な観測は Braganza と Worcester¹²⁾ によって中性子線回折法で行われた。図 6 に 16:0-PC 二重膜を 54.5°C で加圧した際のブラッグ面間隔の変化を示す。150 MPa 以上での急激な面間隔の減少は二重膜の指組み構造に由来する。相図 (図 2) から明らかなように L_{β}' , P_{β}' および $L_{\beta}I$ 相の間に三重点が見られる。三重点の圧力以上でのみ $L_{\beta}I$ 相を観測できることから、この三重点の温度、圧力を (T_i^* , P_i^*) で表す。我々が実験した圧力範囲

図 6 重水中における 16:0-PC 二重膜の膜厚 (ブラッグ面間隔) におよぼす圧力効果¹²⁾
 54.5°C において昇圧 (○) および降下 (●) による膜厚変化を示す。

では炭素数 14 以上のアシル鎖をもつ PC で指組み構造が見られた^{8), 11)}。図 7 (a) に T_i^* および P_i^* のアシル鎖長依存性を示す。鎖長が短くなると P_i^* は双曲線的に上昇するが、 T_i^* は炭素数 15 で極小温度を示す。三重点の温度、圧力と二重膜の指組み構造形成の関係は単調ではない。 T_i^*/P_i^* なる比を取り、アシル鎖長に対してプロットすると図 7 (b) に示すような良い直線関係が得られた。比 T_i^*/P_i^* の物理的意義は定かではないが、体積に比例するような物理量になっていると思われる。 T_i^*/P_i^* がアシル鎖に対して直線的に変化するのには指組み相形成の体積変化が鎖長依存的なためであろうか。また、図 7 (b) は炭素数 13 で T_i^*/P_i^* の値が 0 となっている。炭素数 13 の PC では指組み構造は加圧により誘起されないことを示唆するものであろう。

エタノールを始めとする各種アルコール^{14), 15)}、クロロプロマジンやテトラカインなど²¹⁾ 両親媒性の小さい分子を添加することによっても、16:0-PC 二重膜で $L_{\beta}I$ 相が誘起される。添加物がリン脂質頭部に作用し分子間隔を押し広げる結果、疎水基間の van der Waals 力で二重膜の指組み構造が形成される。その結果、 L_{β}' 相から $L_{\beta}I$ 相へは部分モル体積の減少を伴う。加圧の場合には、系の体積が減少する結果、 $L_{\beta}I$ 相の出現で系は安定化すると考えられる。

7. エステル結合 PC とエーテル結合 PC

DPPC (すなわち 16:0-PC) 分子は 2 本のアシル鎖が

図 7 (a) 飽和アシル鎖ホスファチジルコリン二重膜の三重点 (T_i^* , P_i^*) におよぼすアシル鎖長の影響。
(b) 三重点における温度/圧力比 (T_i^*/P_i^*) とアシル鎖長との間の直線関係。

図8 ジヘキサデシルホスファチジルコリン (DHPC) 二重膜の相図
相転移: (○) $P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$ あるいは $L_{\beta I} \rightarrow L_{\alpha}$, (●) $L_{\beta I} \rightarrow P_{\beta'}$.

脂質分子のグリセロール骨格とエステル結合している。一方、古細菌の細胞膜脂質にはエーテル結合脂質が見出されている。エステル結合とエーテル結合の違いが二重膜の相挙動にどのように影響するのかを調べる目的で、DPPCと炭素数の等しいジヘキサデシルホスファチジルコリン (DHPC) の相転移を観測した。常圧下ではDPPC二重膜とはほぼ等しい温度に T_p と T_m が観測される。転移エンタルピーも両脂質でほぼ等しい。しかしながら、X線回折などの結果では前転移は L_{β} 相から $P_{\beta'}$ 相への転移ではなく、 $L_{\beta I}$ 相から $P_{\beta'}$ 相への転移であることが確かめられている²²⁾。DHPC二重膜のT-P相図を図8に示す⁶⁾。図2(d)と比較すると、DPPC相図の高圧力領域と同じ形の相図となっていることがわかる。エーテル結合脂質の相図がエステル結合脂質の高圧力領域の性質を示すということは、好熱菌、耐圧菌などの古細菌に属する細胞膜がエーテル結合脂質を多く含むという事実と照らして大変興味深い。

8. おわりに

飽和アシル鎖PC二重膜の相図と相転移熱力学量によって二重膜状態のキャラクタリゼーションを行った。ここで紹介した二重膜相転移の他に、例えば16:0-PCでは18℃付近にラメラ結晶 (L_c) 相から $L_{\beta'}$ 相への副転移 (subtransition) が観測されている。二重膜を安定 L_c 相へ移行させるには長時間を要するので、高圧力下における副転移の観測は現在進行中である。これらの結果が揃えば、二重膜相挙動はより完全なものとなるであろう。

文 献

- 1) Wann, K. T. and Macdonald, A. G. (1988) *Prog. Neurobiol.* **30**, 271-307.
- 2) Cossins, A. R. and Macdonald, A. G. (1989) *J. Bioenerg. Biomembr.* **21**, 115-135.
- 3) Hayashi, R. and Balny, C., eds. (1996) *High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Elsevier, Amsterdam.
- 4) 金品昌志, 松本 均 (1995) 高圧力の科学と技術 **4**, 223-230.
- 5) Kaneshina, S., Tamura, K., Kawakami, H. and Matsuki, H. (1992) *Chem. Lett.*, 1963-1966.
- 6) Maruyama, S., Matsuki, H., Ichimori, H. and Kaneshina, S. (1996) *Chem. Phys. Lipids* **82**, 125-132.
- 7) Ichimori, H., Hata, T., Yoshioka, T., Matsuki, H. and Kaneshina, S. (1997) *Chem. Phys. Lipids* **89**, 97-105.
- 8) Ichimori, H., Matsuki, H. and Kaneshina, S. (1998) *Chem. Lett.*, 75-76.
- 9) Kaneshina, S., Ichimori, H., Hata, T. and Matsuki, H. (1998) *Rev. High Pressure Sci. Technol.* **7**, 1277-1279.
- 10) Kaneshina, S., Ichimori, H., Hata, T. and Matsuki, H. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1374**, 1-8.
- 11) Ichimori, H., Hata, T., Matsuki, H. and Kaneshina, S. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1414**, 165-174.
- 12) Braganza, L. F. and Worcester, D. L. (1986) *Biochemistry* **25**, 2591-2596.
- 13) Winter, R. and Pilgrim, W. C. (1989) *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **93**, 708-717.
- 14) Ohki, K., Tamura, K. and Hata, I. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1028**, 215-222.
- 15) Zhang, F. and Rowe, E. S. (1992) *Biochemistry* **31**, 2005-2011.
- 16) Mabrey, S. and Sturtevant, J. M. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3862-3866.
- 17) Stümpel, J., Eibl, H. and Nicksch, A. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **727**, 246-254.
- 18) Lewis, R. N. A. H., Mak, N. and McElhaney, R. N. (1987) *Biochemistry* **26**, 6118-6126.
- 19) Lin, H. N., Wang, Z. Q. and Huang, C. H. (1990) *Biochemistry* **29**, 7063-7072.
- 20) Mason, J. T. and Huang, C. H. (1981) *Lipids* **16**, 604-608.
- 21) McIntosh, T. J., McDaniel, R. V. and Simon, S. A. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **731**, 109-114.
- 22) Laggner, P., Lohner, K., Degovics, G., Muller, K. and Schuster, A. (1987) *Chem. Phys. Lipids* **44**, 31-60.