脂質膜と低分子およびポリペプチドの相互作用

名古屋大学工学部 八 田 一 郎

Based upon the behavior of phase transitions in phospholipid systems, we can consider the interaction between a phospholipid bilayer and molecules, which are, for instance, a small molecule such as cholesterol, an acidic polypeptide such as poly (L-lysine) and a small protein such as melittin. The phase transitions are sensitively influenced by the interactions, where small molecule enters into the bilayer, the acidic polypeptide is adsorbed on the surface of the bilayer, and the small protein goes through the bilayer. By making efficient use of calorimetric measurements, we can discuss the way of the interaction in these typical cases from the viewpoint of thermodynamical stability.

Biomembrane/Lipid/Interaction/Phase Transition/Heat Capacity

1. はじめに

生体由来の脂質あるいはそれに関連した合成脂質の分子集合体は多形をとり、多様な相転移を示す。それについてのデータ量はぼうだいなものとなっている。例えば、Marshの本“CRC Handbook of Lipid Bilayers”には多くのデータが要領よくまとめられている¹⁾。また、Caffreyによるデータベース“LIPIDAT”には脂質の相転移に関する一万件を越えるデータが集録されている²⁾。

例えば、典型的なリン脂質であるジバルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) を水中に分散されると、多層ベシクルを形成し、2分子膜を骨格とする多層構造をとる。それは低温側からサブゲル (L_s) 相、ゲル (L_β') 相、リップル (P_β') 相および液晶 (L_α) 相と呼ばれる相をとる。脂質の種類を変えても相転移温度は違うが同じような相が出現する³⁾。

脂質の相転移の振舞は外部条件に応じて鋭敏に変化するので、表在性あるいは内在性タンパク質と脂質膜の相互作用 (図1中、それぞれAあるいはBを参照)、また、脂質可溶性の低分子と脂質膜の相互作用 (図1中のCを参照) などについて、相転移現象の変化を通して研究することができる。ここでは、上の3つの場合について、モデル系を取り上げて説明する。

図1. 生体膜のモデル, Aは表在性タンパク質, Bは内在性タンパク質, Cは低分子。

2. 酸性リン脂質膜とポリリジンの相互作用

ここではリン脂質としてジバルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG) の場合について、高橋らの論文にしたがって述べる⁴⁾。DPPGは極性頭部に負電荷をもっている。この単一成分から成る系は、前に述べたDPPCと同じような相の振舞をする。図2のAはDPPGにおけるDSC測定によるサーモグラムの例である。これは通常の示差走査熱量測定装置で測定された結果である。ブレ転移およびメイン転移がそれぞれ35°Cと41°Cの温度で出現する。次に負に帯電したDPPG膜と正電荷の側鎖をもつポリペプチドであるポリリジン (poly (L-lysine)) の相互作用を考える。ここでは、DPPG 1分子に対して、ポリリジンのリジン側鎖が2の割合で入れて作られた試料に話をしはる。これはDPPG分子数に対してポリリジン側鎖数が十分に多いという条件になる。ところで、ポリリジンは水中ではランダムコイル構造をとっているが、DPPG 2分子膜上では α -ヘリックス構造と β -シート構造を4:6の割合でとる⁵⁾。上のようにして作られた試料のDSC測定を行うと、図2のBに示すようなサーモ

Interaction of small molecules and polypeptides on lipid membranes

Ichiro HATTA

Department of Applied Physics, School of Engineering,
Nagoya University

図2. A. ジパルミトイルグリセロール (DPPG), B. DPPG とポリリジンから成る系のサーモグラム. これらの測定は熱流束型 DSC (セイコー電子工業 (株) 製 SSC580/DSC10) で行われた. 昇温速度は 1.0K/min. 試料濃度は 3.8wt%⁴⁾.

グラムが得られる. 45.7°C にゲル相から液晶相へのメイン転移のみが現れる. A, B 両者について, メイン転移に着目すると, 転移エンタルピーは両者とも DPPG 1 モル当たり 8.3kcal である. したがって, DPPG の炭化水素鎖の状態変化の様子は両者でほとんど変わらないといえる. しかし, 後者では相互作用の結果, メイン転移温度は上昇し, リップル相は消失している. 上で述べたようにポリリジンは DPPG 2 分子膜上で一定の構造はとらない. にもかかわらず, 相転移挙動の変化は単純である. これは DPPG の頭部とポリリジンのリジン側鎖の間には静電相互作用があり, 特異的な結合がないが一般的な結合があることによっていえると考えられる. この結果から, 表在性タンパク質は, 静電相互作用により, 膜表面上で動きまわることができるという仮説が導ける.

3. 中性リン脂質 2 成分系とメリチンの相互作用

内在性タンパク質と脂質膜の相互作用について (図 1 B 参照), 熱測定を有効に使った研究として, 大木⁶⁾ のジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC) とジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) の 2 成分系と 26 個のアミノ酸残基から成るメリチンに対する研究は大変興味がある. 図 3 は DMPC と DSPC をモル比で 1 : 1 の場合にメリチンの量を増加していくときのサーモグラムの変化である. これは断熱型高感度示差走査熱量計で測定されたものである. メリチ

図3. ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC) とジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) の 2 成分とメリチン (0 ~ 5 mol%) から成る系のサーモグラム. これらの測定はプリバロフ型 DSC (真空理工 (株) 販売 DASM 4) で行われている. 昇温速度は 0.5K/min. 試料濃度は 5 mM⁶⁾.

ン 0 mol% のときの 2 つのプロードなピークは DMPC および DSPC のメイン転移に対応するものである. これにメリチンを加えていくと, 低温側の DMPC に由来する転移ピークは小さくなり, 最終的に消失する. メリチンはほぼ α -ヘリックス構造をとって脂質 2 分子膜中に侵入する. メリチンの疎水性領域の長さが DMPC 膜の疎水性領域の厚さに対応することから, メリチンは DMPC が多く存在する領域に選択的に入ると考えられる. 脂質 2 分子膜と内在性タンパク質の境界にある境界脂質の運動状態は他の部分にある脂質と異なることが知られているが^{7), 8)}, マットレス模型では上に述べたようにある程度の大きさをもつ領域構造ができると提案されている⁹⁾. 大木の研究から, 内在性タンパク質を囲む領域はかなり大きく, 上の場合にはメリチンはその周りに DMPC を拘束し, そのためさらに DMPC が引き寄せられ, 大きいドメインを形成しているといえる.

4. 中性リン脂質とコレステロールの相互作用

これについてはいまままでに数多くの研究がされている. その熱測定についてもしかりである. ここではコ

図4. (A) ジバルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) とコレステロール (mol%でAは0, Bは1, Cは2, Dは3, Eは4, Fは5) から成る系の昇温時のサーモグラム, 図の縦の縮尺は $1 \text{ J cm}^{-3} \text{ K}^{-1}$ を示す. (B) は同じ場合の降温時のサーモグラム. これらの測定は研究室自作の ac カロリメーターを用いて行われた. 昇温・降温速度は 0.04 K/min . 試料濃度は $10 \text{ wt}\%$ ¹¹⁾.

コレステロール濃度の小さい場合のリップル構造に関係した問題を扱う. リン脂質 DMPC, DPPC, DSPC ではいずれもリップル相が出現する. リップル相では, リン脂質 2 分子膜は約 15 nm の周期で波打った構造をとる. それはリップル構造と呼ばれる. このような膜にコレステロールを加えていくと, リップルの周期が広がることが知られている¹⁰⁾. DMPC の場合, コレステロール濃度が $20 \text{ mol}\%$ に達するとリップル構造は消失する. すなわち, リップルの周期が無限大になる. 他のリン脂質においても同様の傾向を示す. ここでは DPPC で現れる準安定リップル相とコレステロールの関係を ac カロリメトリー (ACC) によって研究した結果を紹介する¹¹⁾. ACC は線形比熱を高温度分解能で

測定できるという特徴をもっている. これらの特徴を使って相転移温度近傍の比熱の微妙な振舞を調べることができる. 図4 (A) は昇温時に測定されたリップル相から液晶相へのメイン転移での結果である. コレステロール濃度が増加し, リップルの周期が長くなるとともに, 比熱の振舞が微妙に変わっていることが判る. 図4 (B) は降温時に測定された液晶相から準安定リップル相へのメイン転移での結果である. コレステロール濃度の小さいときの比熱の温度履歴は準安定リップル相の出現と関係している. その温度履歴はコレステロール濃度の増大とともに小さくなる. コレステロール濃度 $5 \text{ mol}\%$ では最早温度履歴はなくなり, 準安定相は消失する. このことは X 線解回折実験からも確かめられている.

文 献

- 1) Marsh, D. (1990) CRC Handbook of Lipid Bilayers, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, U. S. A.
- 2) Caffrey, M. (1993) Lipid Thermotropic Phase Transitions. NIST Standard Reference Database 34. Standard Reference Data, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland, U. S. A.
- 3) 八田一郎 (1992) 表面 **30**, 273.
- 4) Takahashi, H., Matuoka, S., Kato, S., Ohki, K., Hatta, I. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1110**, 29.
- 5) Fukushima, K., Muraoka, Y., Inoue, T., Shimozaawa, R. (1984) *Biophys. Chem.* **20**, 237.
- 6) 大木和夫 (1994) 日本物理学会誌 **49**, 369.
- 7) 桐野豊 (1985) 蛋白質核酸酵素別冊 No. **28**, 144.
- 8) 木下一彦, 池上明 (1985) 蛋白質核酸酵素別冊 No. **28**, 150.
- 9) Bloom, M. Evans, E., Mouritsen, O. G. (1991) *Quart. Rev. Biophys.* **24**, 293.
- 10) 八田一郎 (1988) 生物物理 **28**, 181.
- 11) Hatta, I., Okada, M., Matuoka, S., Yao, H. (1992) *J. Therm. Anal.* **38**, 1775.

はった いちろう

名古屋大学工学部応用物理学科生物理工学講座教授. 「生物物理」 Vol. 28 No. 4 (1988) に詳しい自己紹介を書いたのでそれを見てください. 自然の選択の結果今日ある生きものの, そのからくりの巧妙さ, 複雑ではあるが高次の規則性があることなど興味は尽きない. このような対象に, 物理から迫ってみたい. それに対する私の現在のスタンスについては, 日本物理学会誌 Vol. 49 No. 1 (1994) に述べた.

連絡先 〒464-01 名古屋市千種区不老町 TEL 052-789-4466 FAX 052-789-3724