高圧力下における脂質膜の構造転移と相挙動[†]

金 品 昌 志^{*} 松 木 均^{*} 玉 井 伸 岳^{**}

Structural Transitions and Phase Behavior of Lipid Bilayer Membranes under High Pressure

by

Shoji KANESHINA^{*}, Hitoshi MATSUKI^{*} and Nobutake TAMAI^{**}

Key words : Bilayer phase transition, Lipid bilayers, Phase behavior, Pressure-induced interdigitation, Saturated and unsaturated phospholipids

1 緒 言

生物細胞は生命活動の最小単位である。細胞膜は主に脂質とタンパク質で構成されており、生体細胞膜の基本構造である二分子膜はリン脂質分子の自己組織化によって構築される。膜中に分布する脂質の主要成分はグリセロリン脂質であり、グリセロール骨格に結合した2本の長鎖脂肪酸と親水基から成る両親媒性分子で(図1)、疎水基(R_1 , R_2)の鎖長や二重結合の有無および親水基の組合せにより多数の分子種が存在する。例えばヒト赤血球膜にはホスファチジルコリン(PC)やホスファチジルエタノールアミン(PE)を親水基とする脂質が多く分布しているが、疎水鎖は均一でない。グリセロール骨格の $sn-1$ 位にはパルミチン酸($C_{16}:0$)やステアリン酸($C_{18}:0$)の飽和脂肪酸をエステル結合したものが多く、 $sn-2$ 位にはオレイン酸($C_{18}:1$)、リノール酸($C_{18}:2$)、アラキドン酸($C_{20}:4$)などの不飽和脂肪酸が多く分布している。PC分子の2本の疎水鎖のうち R_1 に飽和脂肪酸(86%)、 R_2 に不飽和脂肪酸(91%)を含んでいる。しかしながら、脂質膜研究で用いられるリン脂質の多くは2本の疎水鎖が同一の対称型リン脂質である。

リン脂質二分子膜の高圧研究は、1) 麻酔作用の圧拮

抗、2) 極限環境で生息する深海生物の高圧環境適応、3) 食品加工における高圧力殺菌など、生体機能への圧力の直接的な作用機構の解明を目的としてきた。研究対象となったリン脂質は当初はジパルミトイルPC($diC_{16}:0$ -PC)に集中していた。麻酔研究では15MPa程度の圧力が使用され、ESR¹⁾とジラトメトリー²⁾による論文が1974年に発表され高圧脂質膜研究が開始された。測定手段も開発され、その後、蛍光^{3), 4)}ラマン⁵⁾NMR^{6), 7)}X線回折⁸⁾中性子回折^{9), 10)}熱測定¹¹⁾などが高圧力下で利用されている。これらの方法を基礎として測定圧力は100MPaを超えると、高圧極限環境下の生物を視野に入れた研究に発展し、さらに近年(約20年)は食品加工に高圧殺菌技術が実用化され600MPaの圧力が生物関連の研究に利用されるようになった。

本稿では、2本の疎水鎖が同じで鎖長および親水基の異なるリン脂質に関して高圧力下での構造転移と二分子膜相挙動が明らかとなったものを、飽和および不飽和疎水鎖に区別して解説する。

2 飽和リン脂質

2・1 ジパルミトイルPC二分子膜

リン脂質二分子膜の構造転移現象は疎水鎖の融解現象が中心的で二分子膜構造のなかで炭化水素鎖の*trans-gauche*のコンホメーション変化を含む。転移温度より低温側では鎖は伸びきった*trans*型コンホメーションで秩序性の高いゲル相となり、高温側では鎖に*gauche*型コンホメーションが増した秩序性の低い液晶相となる。最も代表的なグリセロリン脂質、 $diC_{16}:0$ -PCの常圧下における示差走査熱量法(DSC)によるサーモグラムを図2に示す。長時間(1週間程度)低温保存した $diC_{16}:0$ -PC二分子膜を昇温すると(1st scan)ラメラ結晶(L_c)相からラメラゲル($L_{\beta'}$)相への副転移(subtransition)、 $L_{\beta'}$ 相からリップルゲル($P_{\beta'}$)相への前転移(pretransition)および

図1 グリセロリン脂質の分子構造

[†] 原稿受理 平成20年10月14日 Received Oct. 14, 2008 ©2009 The Society of Materials Science, Japan

^{*} 正 会 員 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部 〒770-8506 徳島市南常三島町, Dept. of Life System, Inst. of Tech. and Sci., The Univ. of Tokushima, Minamijosanjima-cho, Tokushima, 770-8506

^{**} 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部 〒770-8506 徳島市南常三島町, Dept. of Life System, Inst. of Tech. and Sci., The Univ. of Tokushima, Minamijosanjima-cho, Tokushima, 770-8506

図2 (a) diC16:0-PC 二分子膜の DSC サーマグラム、および (b) 脂質分子の化学ポテンシャルの温度依存を示す模式図

$P_{\beta'}$ 相から液晶 (L_{α}) 相への主転移 (main transition) の順に転移を起こす。試料を 5°C まで冷却し、直ちに昇温すると (2nd scan) 前転移と主転移のみが観測できる。冷却による $L_{\beta'}$ 相から L_c 相への移行には長時間を要する。diC16:0-PC 二分子膜では昇温に伴い L_c , $L_{\beta'}$, $P_{\beta'}$ および L_{α} 相の順に転移し、いずれの相も常圧下においては安定相として存在することが化学ポテンシャル-温度曲線から推定できる。高圧力下における二分子膜相転移の検出にはおもに光学的方法を使用した。¹²⁾ diC16:0-PC 二分子膜の温度 (T)-圧力 (P) 相図を二分子膜構造の模式図とともに図 3 に示す。¹³⁾ 3 種類の相転移温度はいずれも加圧により単調に上昇している。傾き (dT/dP) の値は転移の内容によって特徴的となっていることを後述する。 T - P 相図で特徴的なことは 100 MPa 以上で圧力誘起指組みゲル (interdigitated gel: $L_{\beta I}$) 相が形成されることである。この圧力誘起相の構造は最初 Braganza と Worcester⁹⁾ によって中性子回折法によって決定された。 $L_{\beta I}$ 相では向き合う二分子膜の各単分子層が疎水鎖を互いに貫入させて単分子膜程度の厚さになっている。相図から明らかにように $L_{\beta'}$, $P_{\beta'}$ および $L_{\beta I}$ の 3 種類のゲル相多形が確認される。ゲル相における多形の原因は PC 分子の親水基のかさ高い構造にある。コリン基の立体障害のためゲル相の状態では疎水鎖が膜面に対して垂直に配向できず約 30° 傾斜することによって疎水鎖間の安定な距離を保っている。 $L_{\beta I}$ 相では鎖の傾斜から開放され疎水鎖は膜面に対して垂直配向している。

図3 (a) diC16:0-PC 二分子膜の温度-圧力相図、および (b) 二分子膜構造の模式図

2・2 ジアシル PC 二分子膜

疎水鎖の炭素数が 13 から 18 までの飽和ジアシル PC について二分子膜の T - P 相図を図 4 に示す。¹⁴⁾ これらの相図には L_c 相は描かれていない。主転移および前転移温度はすべての脂質で加圧に伴い上昇し、アシル鎖長が増すと高温側にシフトしている。炭素数 14 以上の PC 二分子膜で圧力誘起 $L_{\beta I}$ 相が確認できた。 $L_{\beta'}$ 相と $L_{\beta I}$ 相の相境界は負の傾きを示しており炭素数 17 および 18 の PC では $L_{\beta'}/L_{\beta I}$ 相境界は負の傾きから極小を示して正の傾きに転じている。2 相平衡に関するクラペイロン式

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

より傾き (dT/dP) の正負は、転移体積変化 (ΔV) と転移エンタルピー変化 (ΔH) の符号によって決定される。 $L_{\beta'}$ 相から $L_{\beta I}$ 相への ΔH は正であることから、この転移の ΔV は一般に負であることが比容の測定によって実証されている。¹⁵⁾ diC18:0-PC のように加圧により極小値を示すことは、 ΔV が負から正に転ずることを示唆している。低圧側では $L_{\beta I}$ 相の部分モル体積が $L_{\beta'}$ 相のそれよりも小さかったのが、圧縮率の違い ($L_{\beta I}$ 相の圧縮率が小さい) のため、高圧側では $L_{\beta I}$ 相の部分モル体積が $L_{\beta'}$ 相のそれよりも大きくなったことに起因すると理解される。PC 同族列に対する二分子膜相転移の熱力学量 (ΔH およ

図4 ジアシル PC 二分子膜の温度-圧力相図

び ΔV のアシル鎖長依存性を図5に示す。^{14), 16)}主転移の ΔH および ΔV は共にアシル鎖長が増すと大きくなっている。長鎖化合物の融点と融解熱は鎖長が増すと増大することから、主転移はリン脂質二分子膜における鎖融解現象として十分に理解できる。他方、前転移に関する ΔH および ΔV の値は主転移に比べて極めて小さく、その鎖長依存性もほとんど認められない。 L_β'/P_β' 転移では鎖は全て *trans* 状態 (鎖は伸びたまま) で親水基頭部のパッキングが変化するだけで鎖長には依存しない現象と理解される。 L_β I 相誘起に必要な最低圧力を CIP (critical interdigitation pressure)¹⁴⁾とすれば、CIPは鎖の伸長に伴って急激に低下している (図6)。アシル鎖が長くなると L_β I 相が誘起される圧力は低くなっている。換言すれば疎水鎖間の凝集力が増すと低い圧力で L_β I 相が誘起される。 L_β I 相はアルコール,¹⁷⁾グリセロール,¹⁸⁾エチレングリコール,¹⁹⁾局所麻酔薬 (例えばテトラカインなど)²⁰⁾のような両親媒性分子の添加によって誘起されることが知られている。これらの L_β I 相誘起剤が二分子膜の界面領域に侵入して極性基間の反発力を強め (あるいは引力の相互作用を弱め) た結果、指組み構造を誘起すると考え

図5 ジアシル PC 二分子膜の主転移および前転移に対する相転移熱力学量 (ΔH および ΔV) のアシル鎖長依存性

図6 CIP (critical interdigitation pressure) のアシル鎖長依存性

られている。はたして圧力は極性基間の反発力を生むのであろうか。図6の結果は疎水鎖間の凝集力が増すと L_β I 相を生じ易いことを示している。圧力誘起指組み構造の形成メカニズムは後に考えを示す。

2・3 N-メチル化ジパルミトイル PE 二分子膜

二分子膜相挙動におよぼすリン脂質親水基の構造効果を明らかにするために diC16:0-PC 分子のコリン基に存在する3つのメチル基を逐次水素原子で置換した、ジメチル PE (diC16:0-Me₂PE)、モノメチル PE (diC16:0-MePE) およびエタノールアミン (diC16:0-PE) にいたる N-メチル化 diC16:0-PE 二分子膜の高圧力下における相挙動を比較検討する。¹³⁾まずメチル基が全て水素置換された diC16:0-PE 二分子膜の常圧下における相挙動を DSC サーモグラムで確認しておく (図7)。低温保存した diC16:0-PE 二分子膜を昇温すると (1st scan), L_c 相から L_α 相への転移が観測された。試料を冷却後、直ちに昇温すると (2nd scan) 1st scan の場合よりも低温側に吸熱ピークが観測され、この転移は L_β 相から L_α 相への主転移と同定される。これらの相転移を化学ポテンシャル-温度曲線で表すと L_c/L_α 転移が L_β/L_α 転移より高温で観測されたことから L_β 相は熱力学的には準安定相であることがわかる。冷却により L_c 相を出現させるには長時間を要するため、このように準安定相が再現性良く観測される。加圧により相転移挙動は複雑に変化する。diC16:0-PE 二分子膜の T - P 相図を図8に示す。常圧では準安定相間の転移として存在していた主転移 (L_β/L_α) はその

図7 (a) diC16:0-PE 二分子膜の DSC サーモグラム、および (b) 脂質分子の化学ポテンシャルの温度依存を示す模式図

図8 (a) diC16:0-PE 二分子膜の温度-圧力相図、および (b) 二分子膜構造の模式図

圧力依存性 (dT/dP) が L_c/L_α 相転移のそれよりも大きい場合、加圧により 2 つの相境界線は 21.8 MPa で交差することとなる。さらに高圧力側では主転移温度よりも低温側に L_c 相から L_β 相の転移が観測されるようになり、21.8 MPa 以上の高圧力下では L_β 相は安定相として存在する。図 7 (b) に示すように 21.8 MPa では L_c , L_β および L_α 相の化学ポテンシャル曲線は一点で交わり、それより高圧力側では 3 つの相がそれぞれ安定相として存在できる温度範囲が決まる。

diC16:0-PE を diC16:0-PC と比較すると主転移温度が 21.1°C も高いことがわかる。極性基をジメチル PE およびモノメチル PE と変化させても 2 種類の相転移 (L_c/L_β および L_β/L_α 相転移) が観測され高圧力下で相境界線が交差することはなかった。極性基の異なるこれら 4 種類の脂質二分子膜において主転移温度はほぼ等間隔で diC16:0-PC, diC16:0-Me₂PE, diC16:0-MePE および diC16:0-PE の順に上昇した。これら 4 種類のリン脂質二分子膜における相転移熱力学量を表 1 に示す。各脂質の主転移を比較すると、転移温度が顕著に変化しているにもかかわらず相転移熱力学量 (ΔH , ΔS および ΔV) には明瞭な差が認められない。これら 4 種類の脂質ではアシル鎖長が全て同一であることから、主に鎖融解現象が反映される主転移では熱力学量に差が見られなかった。極性基頭部の構造のわずかの違いが主転移温度にのみ強く反映されている。極性基頭部は膜面に対して垂直でなく、大きく傾斜したコンホメーションをとっていることから、コリン基の正電荷は隣接する分子のリン酸基の負電荷に接近し、この静電引力的相互作用が膜の安定性に貢献している。コリンのメチル基を水素置換することにより隣接分子との間でさらに水素結合が形成され引力的相互作用が強化される。置換水素原子の数が増すと水素結合能は段階的に増し、diC16:0-PE で最も転移温度が高くなるものと思われる。diC16:0-PC 以外ではゲル相の多形が見られず圧力誘起 $L_\beta I$ 相も検出されなかった。 L_β 相では鎖が膜面に垂直配向しているため多形を生じなかったものと判断される。 $L_\beta I$ 相の形成には極性基間の強い引力的相互作用は不適切であると思われる。

2・4 エーテル結合型ジアルキル PC 二分子膜

前述のジアシル PC は疎水鎖がグリセロール骨格とエステル結合した脂質であるのに対して、生体膜にはエーテル結合した脂質の存在も知られている。エーテル結合型脂質の *O*-diC16:0-PC はエステル結合型脂質 diC16:0-PC と比べて分子構造のうえではカルボニル基 ($>C=O$) がメチレン基 ($-\text{CH}_2-$) に変わっただけで、二分子膜の主転移温度と前転移温度は極めて似ている。主転移は両脂質共に P_β' 相から L_α 相への転移であるが、*O*-diC16:0-PC 二分子膜の前転移は $L_\beta I$ 相から P_β' 相への転移であることがすでに知られている。²¹⁾ すなわち、常圧下ですでに水和のみによって指組み構造を形成している。アルキル鎖の炭素数が 12, 14, 16 および 18 のジアルキル PC 二分子膜の *T*-*P* 相図を図 9 に示す。²²⁾ アルキル鎖長の異なる 4 種類のエーテル結合型脂質は相似の *T*-*P* 相図であり、全ての脂質で $L_\beta I$ 相が出現している。前転移 ($L_\beta I/P_\beta'$ 相転移) に対する相図の傾き (dT/dP) が主転移に対するそれよりも大きい場合 2 本の相境界線はある圧力で交わり、それより高圧力側では P_β' 相は消滅し、 $L_\beta I$ 相から L_α 相への主転移のみが観測される。鎖長の短い *O*-diC12:0-PC 二分子膜では常圧において主転移のみが観測されているが高圧力下では主転移と前転移が観測されたことから、前転移の常圧への外挿は -50.0°C を与える。非常に低温であるため実際にこれまでの DSC 測定では検出されていない。図 9 に示した圧力範囲ではジアルキル PC 二分子膜の L_α , P_β' および $L_\beta I$ 相以外に新しい圧力誘起相は発見されていない。 $L_\beta I$ 相は加圧によりその安定領域を拡張している。他方、 P_β' 相の安定領域は加圧により狭くなり、アルキル鎖長が増すとより低い圧力で消滅することがわかる。

エーテル結合型脂質とエステル結合型脂質を比較すると、分子構造上のわずかの違いが二分子膜の *T*-*P* 相図上には大きな差異として現れた。すなわち、エーテル結合型脂質二分子膜には L_β' 相が存在せず、常圧においてすでに $L_\beta I$ 相が形成されている。 L_α 相における諸物性には顕著な差が観測されていないことから、分子構造の違いは秩序性の高い分子配向、すなわち脂質分子が隣接した

表 1 *N*-メチル化 PE 二分子膜の相転移熱力学量

Lipid	Transition	Transition Temp.		dT/dP (K MPa ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J K ⁻¹ mol ⁻¹)	ΔV (cm ³ mol ⁻¹)
		(K)	(°C)				
diC16:0-PC	L_c/L_β'	293.6	20.4	0.180	22.5	77	13.9
	L_β'/P_β'	309.0	35.8	0.130	5.4	17	2.2
	P_β'/L_α	314.8	41.6	0.220	36.4	116	25.2
diC16:0-Me ₂ PE	L_c/L_β	302.6	29.4	0.170	24.5	81	13.8
	L_β/L_α	322.4	49.2	0.230	36.8	114	26.2
diC16:0-MePE	L_c/L_β	308.7	35.5	0.160	25.4	82	13.1
	L_β/L_α	331.2	58.0	0.246	35.6	107	26.4
diC16:0-PE	L_c/L_α	337.5	64.3	0.230	74.3	220	50.6
	L_c/L_β	—	—	0.160	—	—	—
	L_β/L_α	336.3	63.1	0.264	34.7	103	27.2

図9 エーテル結合型脂質, ジアルキル PC 二分子膜の温度-圧力相図

場合の二分子膜の性質に反映されると期待される。そこで主転移に伴うエンタルピー変化の値について精査した。詳しい熱力学的データは原著²²⁾を参照していただくとして、結果の概要について述べる。ジアシル PC およびジアルキル PC 二分子膜の主転移に対する ΔH は鎖長依存的に変化することから、これらの脂質でメチレン基 ($-\text{CH}_2-$) を付加した場合とカルボニル基 ($>\text{C}=\text{O}$) を付加した場合の主転移温度および ΔH の値への寄与を算出した。主転移温度に関しては、メチレン基を付加してもカルボニル基を付加しても昇温効果が認められるが、カルボニル基の付加による温度上昇幅はメチレン基を付加した場合より小さい。エンタルピー変化に関しては、メチレン基の付加による ΔH 増分よりはカルボニル基付加による ΔH 増分の方が大きい。カルボニル基の導入は二分子膜における極性基間の引力的相互作用を強めていることが示唆される。したがって、エーテル結合型脂質の二分子膜で働く分子間力(特に、極性基間相互作用)はエステル結合型脂質二分子膜中の分子間力よりも弱いと結論付けることができる。この微妙な分子間力の差が $L_{\beta}\text{I}$ 相形成と深くかかわっている。

2・5 圧力誘起 $L_{\beta}\text{I}$ 相形成のメカニズム

指組み構造形成に必要な親水基の構造を確認するため、すでに常圧下で $L_{\beta}\text{I}$ 相を形成しているエーテル結合型脂質 $O\text{-diC16:0-PC}$ のコリンのメチル基を逐次水素原子で置換した N -メチル化ジアルキル PE, $O\text{-diC16:0-Me}_2\text{PE}$, $O\text{-diC16:0-MePE}$ および $O\text{-diC16:0-PE}$ について二分子膜の T - P 相図を作成し、 $L_{\beta}\text{I}$ 相の有無を確認した²³⁾200MPa までの圧力範囲では唯一主転移のみ観測され圧力誘起 $L_{\beta}\text{I}$ 相は確認できなかった。エステル結合型およびエーテル結合型の N -メチル化 PE について、常圧下の主転移温度と $L_{\beta}\text{I}$ 相の有無を表2にまとめた。 $O\text{-diC16:0-PC}$ 二分子膜では常圧において $L_{\beta}\text{I}$ 相を形成し

表2 エステル結合型およびエーテル結合型 N -メチル化 PE 二分子膜の主転移温度 (T_m) と指組みゲル ($L_{\beta}\text{I}$) 相の有無

エステル型	diC16:0-PC	diC16:0-Me ₂ PC	diC16:0-MePC	diC16:0-PE
$T_m / ^\circ\text{C}$	42.0	49.2	58.0	63.1
$L_{\beta}\text{I}$ 相形成	○	×	×	×
エーテル型	O-diC16:0-PC	O-diC16:0-Me ₂ PC	O-diC16:0-MePC	O-diC16:0-PE
$T_m / ^\circ\text{C}$	43.6	51.2	61.9	70.8
$L_{\beta}\text{I}$ 相形成	◎	×	×	×

◎: 常圧下で $L_{\beta}\text{I}$ 相を形成する。○: $L_{\beta}\text{I}$ 相は加圧によって誘起される。

×: 加圧によっても $L_{\beta}\text{I}$ 相は形成しない。

たが、エーテル結合型 PC のコリンのメチル基が1ヶ所でも水素原子に置換されると高圧力下においてさえも $L_{\beta}\text{I}$ 相を形成しなくなる。これらのことから、常圧あるいは高圧力下で $L_{\beta}\text{I}$ 相が形成されるためには、極性基頭部がコリン基であることが必要条件であって、エーテル結合型脂質で十分ということではない。

エステル結合型ジアシル PC はエーテル結合型ジアルキル PC よりも二分子膜中で極性基間の相互作用が若干強いために常圧では $L_{\beta}\text{I}$ 相が形成されず、加圧によって誘起された。それでは圧力はジアシル PC の極性基間相互作用を弱めたのであろうか。一般に流体を圧縮すると圧力は均一に伝ばし流体を高密度化するため、分子間距離は短くなり分子間相互作用を強める。このように考えると加圧により $L_{\beta}\text{I}$ 相が誘起される現象は一見矛盾しているように思われる。加圧により極性基間の引力的相互作用が反発力へと転化する仕組みが存在する必要がある。図10には相転移に伴う膜厚の変化⁹⁾および脂質部分比容の変化¹⁵⁾を示した。 diC16:0-PC 二分子膜を約 55°C で圧縮すると二分子膜は L_{α} 相から P_{β}' 相を経て $L_{\beta}\text{I}$ 相へ転移する。 $L_{\alpha} \rightarrow P_{\beta}'$ 転移では加圧により膜厚は増している。 $P_{\beta}' \rightarrow L_{\beta}\text{I}$ 転移では加圧により膜厚は減少するが膜面積は膨張している。このように、水中に分散したベシクル二分子膜を加圧すると等方的ではなく非等方的な圧縮が起こっている。 $L_{\beta}\text{I}$ 相の部分比容は最も小さく、加圧により常に体積が減少する方向に転移が起こっており、ル・シャトリエの原理に矛盾していない。加圧が極性基間に反発力を生む仕組みを以下のように考えている。²⁴⁾ジアシル PC 分子の極性基頭部はコリン基が正に、リン酸基が

図10 相転移に伴う (a) 膜厚変化および (b) 脂質部分比容変化

負に帯電した両性イオンである。図 11 に示すように、二分子膜のゲル状態では極性基頭部は膜面に対して平行に近く傾斜している。垂直に立っていると隣り合う分子間で静電的反発力が強くなり二分子膜は不安定となる。加圧によって分子が接近すると遷移的に極性基頭部が膜面から起き上がり、ある一定の傾斜角度を境として静電的な引力的相互作用から反発的相互作用に転ずるのであろう。このように加圧が極性基間の反発力を遷移的に生み出すことにより、引き続き疎水鎖の凝集力が働いて指組み構造が誘起されると考えている。

3 不飽和リン脂質

3・1 ジオレオイル PC 二分子膜

不飽和脂肪酸をエステル結合したリン脂質二分子膜のゲルー液晶相転移温度は一般に低く、0℃以下で観測されることが多い。溶媒である水が凝固するので測定方法によっては不都合な場合がある。しかしながら、水の凝固点は 207MPa まで加圧すると-22℃まで降下することから、高圧力下での相転移観測は水の凝固を回避することができ、有効な情報を得ることができる。

最も代表的なオレイン酸（炭素数 18 で鎖の中央に *cis* 型二重結合をもつ）をエステル結合したリン脂質、ジオレオイル PC (diC18 : 1-PC) については、従来より DSC 測定による研究が報告されてきた。^{25)~30)} 代表的な結果を表 3 にまとめて示した。diC18 : 1-PC 二分子膜は水中および不凍剤としてエチレングリコール (EG) を添加した水溶液中においても唯一の吸熱ピークを示した。転移温度と転移エンタルピーは測定者によってその値に変動がみられるが、Lewis らの値が最も信頼できる。多くの研究者はこの転移をゲルー液晶相転移と結論付けていたが、Lewis ら²⁵⁾のみが水中における-17.3℃の転移は L_c 相から L_α 相への転移であると述べている。EG 添加 (50 wt%) に

図 11 脂質二分子膜の圧力誘起指組み構造形成のメカニズム

表 3 diC18:1-PC 二分子膜の DSC 測定結果

Transition temp. (°C)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	Literature	
In water			
-16.5	8.0	Davis and Keough	(1983)
-17.3	7.8	Lewis et al.	(1988)
-21.0	7.7	Barton and Gunstone	(1975)
In 50wt% EG sol.			
-11.8	15.6	Lewis et al.	(1988)
-14.0	11.2	van Dijck et al.	(1976)
-15.0	11.2	de Kruijff et al.	(1973)
-15.8	—	Silvius and McElhaney	(1979)

よって転移温度は-11.8℃まで上昇し、 ΔH の値は約2倍となっていることから、EG 添加は diC18 : 1-PC 二分子膜の L_c 相を安定化させるものと理解できる。我々は高圧力下での相転移観測から転移の種類に関する課題の解決を試みた。水中における diC18 : 1-PC 二分子膜の T - P 相図を図 12 に示す。³¹⁾ diC18 : 1-PC のベシクル水溶液を定圧昇温した場合と定温加圧した場合にそれぞれ転移が観測でき、 T - P 相図には 1 本の直線を形成した。常圧下への外挿値は-40.3℃となり表 3 に示したいずれの DSC の結果とも一致しない。この転移はこれまで他のリン脂質に対するのと同じ方法で観測した結果で、ゲルー液晶 (L_β/L_α) 相転移であると判断した。Lewis らが述べている L_c/L_α 転移とは別の転移であり、 L_c の出現には長時間を要するはずである。そこで 300MPa、0℃で3日間保持したのち定圧昇温観測すると別の転移を検出することができた。これらの観測点は相図上で別の直線を形成し、常圧下への外挿は-17.2℃となり DSC 測定と一致した。50wt% EG 水溶液中での結果は L_c/L_α 相転移の常圧下への外挿は-12.0℃となり³²⁾ Lewis らの結果と良い一致を示した。また L_β/L_α 相転移温度は EG を添加しても水中の結果と同一線状にのることがわかった。 L_c/L_α 相転移の特徴は dT/dP の値が L_β/L_α 相転移のそれよりも小さくなることである。その原因はクラペイロン式から予想されるように、 ΔH の値が著しく異なるためであろう。2種類の相転移は dT/dP 値が著しく異なるため相境界線は 234MPa で交叉した。これより高圧力側では L_c/L_β と L_β/L_α の2つの相転移を観測することができ、 L_β 相は安定相として存在できるが、234MPa 以下で見られる L_β 相は準安定相である。常圧付近では L_c/L_α 相転移温度と L_β/L_α 相転移温度の差が著しく大きくなり、ついに L_β 相は不安定となり DSC 測定では検出できなくなっていると思われる。

図 12 水中における diC18 : 1-PC 二分子膜の温度-圧力相図

3・2 *N*-メチル化ジオレオイル PE 二分子膜

2本の疎水鎖は全てオレイン酸から成り、親水基頭部の構造が異なる *N*-メチル化ジオレオイル PE の二分子膜相挙動を比較してみよう。4種類の不飽和リン脂質、diC18:1-PC, diC18:1-Me₂PE, diC18:1-MePE および diC18:1-PE 二分子膜の DSC サーマグラムを図 13 に示す。³¹⁾ *N*-メチル化飽和 PE 二分子膜の場合とは異なり、*N*-メチル化不飽和 PE 二分子膜ではいずれの脂質においても 0℃以下の低温で唯一の吸熱ピークを示している。転移温度はコリンのメチル基を水素原子置換すると逐次上昇し、-17.2, -12.3, -7.2, -5.5℃を示した。相転移エンタルピーは水素置換が進行してもほとんど変化せず、順に 29.4, 31.6, 29.8 および 28.0 kJ mol⁻¹ であった。転移温度の上昇は極性基間での水素結合能の増加を反映していると思われる。この転移については多くの研究者は L_β/L_α 相転移であるとみなし、何ら疑念を抱いていなかったようである。

diC18:1-Me₂PE, diC18:1-MePE および diC18:1-PE 二分子膜の *T*-*P* 相図を、diC18:1-PC 二分子膜で得られた水中における 2 種類の相境界線と共に図 14 に示す。³¹⁾ diC18:1-PC 以外の脂質では高圧力下においても唯一の相転移を示した。全ての相境界線は diC18:1-PC 二分子膜の L_c/L_α 転移とほぼ平行であり、常圧下への外挿は DSC 測定の結果とよい一致を示した。これまでの相挙動に関するデータの蓄積は、相転移の種類が同じであれば類似した d*T*/d*P* 値となることが示されている。したがって、diC18:1-Me₂PE, diC18:1-MePE および diC18:1-PE 二分子膜で観測された唯一の相転移は L_β/L_α 転移とみなすより、L_c/L_α 転移であると考えの方が良さそうである。ところで、不飽和リン脂質では L_β 相より L_c 相が出現しやすく、安定なのは何故であろうか。X 線回折の結果では L_c 相がより密なパッキングをしており結晶状態に近いことが同われる。児玉ら^{33)~35)}は水分率を変化させたリン脂質-水系の氷融解 DSC 測定より、二分子膜間に存在する層間水の挙動に注目し、L_c 相と L_β 相の違いを明確にしている。極性基にコリン基をもつ diC16:0-PC 二分子

図 13 *N*-メチル化ジオレオイル PE 二分子膜の DSC サーマグラム

図 14 *N*-メチル化ジオレオイル PE 二分子膜の温度-圧力相図

膜ゲル相では 10 分子（脂質 1 分子当たり）の層間水が存在するが、極性基にエタノールアミン基をもつ diC14:0-PE 二分子の L_β 相では 6 分子（そのうち 2 分子は不凍結層間水）と少なく、L_c 相になると 1 分子の不凍結層間水のみとなる。不飽和リン脂質での類似の研究結果は知られていないが、層間水のはずれ易さが L_c 相の安定性と深く関わっていると推測される。*N*-メチル化ジオレオイル PE 二分子膜の相転移温度は大気圧下においていずれも水の凝固点以下であることから十分な水和が達成できず、L_β 相よりも L_c 相が安定に存在するものと思われる。

4 結 言

生体細胞膜を構成している多種多様なリン脂質を飽和および不飽和という分類で、二分子膜相挙動を親水基頭部と疎水鎖の寄与によって整理してみた。2本の疎水鎖が同一の対称型リン脂質に限定したが、天然由来のリン脂質は緒言で述べたように非対称型リン脂質として広く分布している。しかしながら、脂質二分子膜が示す相状態は共通しており、その基本は L_c, L_β および L_α 相と思われる。コリン基を極性頭部にもつ脂質ではゲル相に多形現象があり L_β', P_β' および L_βI 相などに分化している。種々のリン脂質二分子膜における相の安定性は一見複雑のようであるが、その中にも規則性を見出すことができる。相転移および相の安定性を考えるために、リン脂質の各相状態における自由エネルギー（化学ポテンシャル）の温度と圧力依存性を図式化し図 15 に示した。この図は化学ポテンシャル-温度線図として描いてあり、傾きは各相状態のエントロピーに対応する。圧力依存性は化学ポテンシャルプロファイルを一定間隔で左右にシフトさせ、右に寄るほど高圧力となる。2つの相状態を示す化学ポテンシャル曲線の交差する温度が相転移温度である。図の左寄り（低温度、低圧力）では L_β/L_α 相転移温度は L_c/L_α 相転移温度より低くなっており、L_β 相は

図 15 リン脂質二分子膜における化学ポテンシャル-温度曲線

準安定相として存在することを示すことができる。diC16 : 0-PE や diC18 : 1-PC 二分子膜相図がこれに該当し、2つの相境界線はある圧力で交叉することとなる。diC18 : 1-PC や diC18 : 1-PE の常圧付近では L_c/L_α 相転移のみが観測されているのは、図 15 のさらに左寄りの領域で、 L_β/L_α 相転移温度が L_c/L_α 相転移温度より著しく低くなり L_β 相は不安定相となり DSC 検出が不可能になったものと理解できる。図の右寄り（高温度、高圧力領域）では L_c 、 L_β および L_α 相が全て安定相として観測できる。飽和のジアシル PC 二分子膜がこれに該当するが、ゲル相に多相が存在するため化学ポテンシャル曲線をさらに L_β' 、 P_β' および $L_\beta I$ 相に分化して考えれば良い。一般に L_c 相が出現するには低温長期保存のような前処理を必要とするが、熱処理（アニーリング）が不十分な場合には L_c 相は検出できず L_β/L_α 相転移のみを観測することになる。化学ポテンシャルプロファイルは脂質分子構造と相関しており、PC 二分子膜は図の右寄り、PE 二分子膜は左寄りに位置した化学ポテンシャルプロファイルとなり、飽和アシル鎖を不飽和アシル鎖に置換するとプロファイルは左寄りにシフトすると考えれば種々のリン脂質の二分子膜相挙動を予測することが可能となるであろう。

参 考 文 献

- 1) J. R. Trudell, D. G. Payan, J. H. Chin and E. N. Cohen, "Pressure-induced elevation of phase transition temperature in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. An electron spin resonance measurement of the enthalpy of phase transition", *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.373, pp.436-443 (1974).
- 2) K. R. Srinivasan, R. L. Kay and J. F. Nagle, "The pressure dependence of the lipid bilayer phase transition", *Biochemistry*, Vol.13, pp.3494-3496 (1974).
- 3) P. L. G. Chong and G. Weber, "Pressure dependence of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatrien fluorescence in single-component phosphatidylcholine liposomes", *Biochemistry*, Vol.22, pp.5544-5550 (1983).

- 4) P. L. G. Chong, "Effects of hydrostatic pressure on the location of PRODAN in lipid bilayers and cellular membranes", *Biochemistry*, Vol.27, pp.399-404 (1988).
- 5) P. T. T. Wong and H. H. Mantsch, "Effects of hydrostatic pressure on the molecular structure and endothermic phase transitions of phosphatidylcholine bilayers : A Raman scattering study", *Biochemistry*, Vol.24, pp.4091-4096 (1985).
- 6) J. Jonas, C. L. Xie, A. Jonas, P. J. Grandinetti, D. Campbell and D. A. Driscoll, "High-resolution ^{13}C NMR study of pressure effects on the main phase transition in L_α -dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles", *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.*, Vol.85, pp.4115-4117 (1988).
- 7) D. A. Driscoll, S. Samarasinghe, S. Adamy, J. Jonas and A. Jonas, "Pressure effects on dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers measured by ^2H nuclear magnetic resonance", *Biochemistry*, Vol.30, pp.3322-3327 (1991).
- 8) J. Stamatoff, D. Guillon, L. Powers and P. Cladis, "X-ray diffraction measurements of dipalmitoylphosphatidylcholine as a function of pressure", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.85, pp.724-728 (1978).
- 9) L. F. Braganza and D. L. Worcester, "Hydrostatic pressure induces hydrocarbon chain interdigitation in single component phospholipid bilayers", *Biochemistry*, Vol.25, pp.2591-2596 (1986).
- 10) R. Winter and W. C. Pilgrim, "A SANS study of high pressure phase transitions in model biomembranes", *Berichte der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie*, Vol.93, pp.708-717 (1989).
- 11) S. Utoh and T. Takemura, "Phase transition of lipid multilamellar aqueous suspension under high pressure I. Investigation of phase diagram of dipalmitoylphosphatidylcholine bimembrane by high pressure -DTA and -dilatometry", *Japanese Journal of Applied Physics*, Vol.24, pp.356-360 (1985).
- 12) S. Maruyama, H. Matsuki and S. Kaneshina, "Thermotropic and barotropic phase behavior of dihexadecylphosphatidylcholine bilayer membrane", *Chemistry and Physics of Lipids*, Vol.82, pp.125-132 (1996).
- 13) M. Kusube, H. Matsuki and S. Kaneshina, "Thermotropic and barotropic phase transitions of *N*-methylated dipalmitoyl-phosphatidylethanolamine bilayers", *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.1668, pp.25-32 (2005).
- 14) H. Ichimori, T. Hata, H. Matsuki and S. Kaneshina, "Barotropic phase transitions and pressure-induced interdigitation on bilayer membranes of phospholipids with varying acyl chain lengths", *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.1414, pp.165-174 (1998).
- 15) K. Ohki, K. Tamura and I. Hata, "Ethanol induces interdigitated gel phase between lamellar gel phase and ripple phase in phosphatidylcholine membranes : a scanning density meter study", *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.1028, pp.215-222 (1990).

- 16) H. Ichimori, T. Hata, T. Yoshioka, H. Matsuki and S. Kaneshina, "Thermotropic and barotropic phase transition on bilayer membranes of phospholipids with varying acyl chain lengths", *Chemistry and Physics of Lipids*, Vol.89, pp.97-105 (1997).
- 17) E. S. Rowe and J. M. Champion, "Alcohol induction of interdigitation in distearoylphosphatidylcholine : fluorescence studies of alcohol chain length requirements", *Biophysical Journal*, Vol.67, pp.1885-1895 (1994).
- 18) T. J. McIntosh, R. V. McDaniel and S. A. Simon, "Induction of an interdigitated gel phase in fully hydrated phosphatidylcholine bilayers", *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.731, pp.109-114 (1983).
- 19) M. Yamazaki, M. Ohshika, N. Kashiwagi and T. Asano, "Phase transitions of phospholipids vesicles under osmotic stress and in the pressure of ethylene glycol", *Biophysical Chemistry*, Vol.43, pp.29-37 (1992).
- 20) T. Hata, H. Matsuki and S. Kaneshina, "Effect of local anesthetics on the bilayer membranes of dipalmitoylphosphatidylcholine : interdigitation of lipid bilayer and vesicle-micelle transition", *Biophysical Chemistry*, Vol.87, pp.25-36 (2000).
- 21) M. J. Ruocco, D. J. Siminovitch and R. G. Griffin, "Comparative study of the gel phases of ether- and ester-linked phosphatidylcholines", *Biochemistry*, Vol.24, pp.2406-2411 (1985).
- 22) H. Matsuki, E. Miyazaki, F. Sakano, N. Tamai and S. Kaneshina, "Thermotropic and barotropic phase transitions in bilayer membranes of ether-linked phospholipids with varying alkyl chain lengths", *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.1768, pp.479-489 (2007).
- 23) S. Kaneshina, M. Goto, K. Tada, N. Tamai and H. Matsuki, "Interdigitation of ether-linked phospholipid bilayers", *Proceedings of the 15th Symposium for Japanese Research Group of High Pressure Bioscience and Biotechnology*, High Pressure Bioscience and Biotechnology, Vol.2, pp.75-81 (2008).
- 24) M. Goto, M. Kusube, N. Tamai, H. Matsuki and S. Kaneshina, "Effect of hydrostatic pressure on the bilayer phase behavior of symmetric and asymmetric phospholipids with the same total chain length", *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.1778, pp.1067-1078 (2008).
- 25) R. N. A. H. Lewis, B. D. Sykes and R. N. McElhaney, "Thermotropic phase behavior of model membranes composed of phosphatidylcholines containing *cis*-mono unsaturated acyl chain homologues of oleic acid : differential scanning calorimetric and ^{31}P NMR spectroscopic studies", *Biochemistry*, Vol.27, pp.880-887 (1988).
- 26) P. J. Davis and K. M. W. Keough, "Differential scanning calorimetric studies of aqueous dispersions of mixtures of cholesterol with some mixed-acid and single-acid phosphatidylcholines", *Biochemistry*, Vol.22, pp.6334-6340 (1983).
- 27) J. R. Silvius and R. N. McElhaney, "Effects of phospholipid acyl chain structure on thermotropic phase properties. 2 : Phosphatidylcholines with unsaturated or cyclopropane acyl chains", *Chemistry and Physics of Lipids*, Vol.25, pp.125-134 (1979).
- 28) P. W. N. Van Dijk, B. De Kruijff, L. L. M. Van Deenen, J. De Gier and R. A. Demel, "The preference of cholesterol for phosphatidylcholine in mixed phosphatidylcholine-phosphatidylethanolamine bilayers", *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.455, pp.576-587 (1976).
- 29) P. G. Barton and F. D. Gunstone, "Hydrocarbon chain packing and molecular motion in phospholipid bilayers formed from unsaturated lecithins", *Journal of Biological Chemistry*, Vol.250, pp.4470-4476 (1975).
- 30) B. De Kruijff, R. A. Demel, A. J. Slotboom, L. L. M. Van Deenen and A. E. Rosenthal, "The effect of the polar head-group on the lipid-cholesterol interaction : A monolayer and differential scanning calorimetry study", *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.307, pp.1-9 (1973).
- 31) M. Kusube, M. Goto, N. Tamai, H. Matsuki and S. Kaneshina, "Bilayer phase transitions of *N*-methylated dioleoylphosphatidylethanolamines under high pressure", *Chemistry and Physics of Lipids*, Vol.142, pp.94-102 (2006).
- 32) S. Kaneshina, H. Ichimori, T. Hata and H. Matsuki, "Barotropic phase transitions of dioleoylphosphatidylcholine and stearyl-oleoylphosphatidylcholine bilayer membranes", *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.1374, pp.1-8 (1998).
- 33) M. Kodama, H. Hashigami and S. Seki, "Static and dynamic calorimetric studies on the three kinds of phase transitions in the systems of L- and DL-dipalmitoylphosphatidylcholine/water", *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.814, pp.300-306 (1985).
- 34) M. Kodama, H. Aoki, H. Takahashi and I. Hatta, "Inter-lamellar waters in dimyristoylphosphatidylethanolamine-water system as studied by calorimetry and X-ray diffraction", *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.1329, pp.61-73 (1997).
- 35) M. Kodama, H. Kato and H. Aoki, "The behavior of water molecules in the most stable subgel phase of dimyristoylphosphatidylethanolamine-water system as studied by differential scanning calorimetry", *Thermochimica Acta*, Vol.352/353, pp.213-221 (2000).