シンクロトロン放射光による磷脂質膜の構造の研究 II.

—配向膜および単分子膜—

松岡審爾・八田一郎

名古屋大学工学部 応用物理学科 ☎ 464-01 名古屋市中種区不老町

Recent developments of the structural study of phospholipid membrane by synchrotron X-ray scattering II. Oriented multibilayers and monolayers

Sinzi Matuoka, Ichiro Hatta

Department of Applied Physics, School of Engineering, Nagoya
University, Chikusa-ku, Nagoya 464-01, Japan

Study on well oriented phospholipid multibilayers is important in getting an evidence for their structures in detail because it is possible to assign the X-ray scattering direction and therefore to give the configuration of molecules. Very high resolution X-ray diffraction experiment for oriented multibilayers is accessible using synchrotron X-ray beam. Recently the Bragg peaks reflected by a monolayer were observed by making the best of extremely high intensity of synchrotron X-ray beam.

Key words : synchrotron X-ray radiation, phospholipid, oriented multibilayer, monolayer

1. はじめに

本稿のⅠ. ではシンクロトロン放射光を用いた磷脂質多重層膜ベシクルの研究の現況を述べた。Ⅱ. では引き続いて放射光を用いた磷脂質配向膜、磷脂質単分子膜の研究の現状を紹介する。配向膜を用いる利点は、散乱されたX線の方向についての情報が得られる点にある。これによって水中に分散された多重層膜ベシクルにつきものである回折ピークの指数付けの困難さが解消される。一方、水の表面に磷脂質分子が一層のみ並んでいる単分子膜の研究は膜構造中の最も単純な系として重要であるが、従来のX線発生装置では回折強度が弱すぎるため回折ピークの観測は不可能であった。シンクロトロン放射光の登場によって一気に輝度の問題が解決し、単分子膜の構造に関する描像に新しい光を当てつつある。

2. 自由膜

親指と人差し指で輪をつくり石鹼水に手を浸し再びひきあげると石鹼膜ができるが、このような膜が自由膜 (freely suspended films) である。G. S. Smith ら¹⁾ は主転移温度以上の DMPC (ジミリスチルホスファチジルコリン) 多重層膜ベシクルの懸濁液を、穴に掃くように塗り付けることによって自由膜を作成した。この膜は水分が蒸発すると不安定となりはじけてしまうが、温度と湿度が調節された環境下では安定に存在する。しかも、脂質二重層膜面は 0.1° 以内にそろって配向し、400 層ほどの膜が積層しているという。

彼らは米国の Oak Ridge にある The National Synchrotron Light Source (NSLS) の放射光を用いて自由膜の超高分解能X線回折像を観測した²⁾。まず、脂質二重層膜間の距離を温度と湿度を変えて測定すると、水

図1. DMPC 自由膜の湿度—温度平面における相図
液晶相 L_α , リップル相 P_β の他, 3 種類の
 L_β 相 ($L_{\beta F}$, $L_{\beta L}$, $L_{\beta I}$) が見られる.
(G. S. Smith et al.: Phys. Rev. Lett.,
60, 813 (1988) より)

中に懸濁された DMPC 多重層膜ベシクルと同様に L_α 相, P_β 相および L_β 相が存在することがわかった. ところが L_β 相内で, 炭化水素鎖配列による回折像の異なる 3 種類の相のあることが明らかになった. $L_{\beta F}$, $L_{\beta L}$, $L_{\beta I}$ と名付けられたこれらの相は図1の湿度—温度関係で示される.

図2(a)~(c)には, 二重層膜面に平行にX線を入射したとき表れる L_β 各相における回折パターンを示す. ここで, 二重層膜の法線方向と q_z 軸は平行であり, 二重層膜のくりかえし周期(ラメラ周期)による回折ピークは図の範囲外にでてしまうのでみえないが q_z 軸(子午線)上に現れているはずである. 一方, 炭化水素鎖配列に由来する回折ピークについては, 二重層間での炭化水素鎖間の相関はなく, 一層の膜に着目したときその反射面が二重層膜面に対して垂直であるとすれば, $q_\parallel$ 軸(赤道)上に回折ピークが表れるはずである. 図2(c)の右側の回折ピークがその例である. 一方, 反射面が傾いている場合は, 赤道上ではなく傾き角だけ上下にずれた位置($q_z \neq 0$)に回折ピークが表れる.

彼らは2つのパラメーターによって回折パターンを説明できることを示した. 一つは炭化水素鎖の膜面に対する傾き角 θ である. もうひとつは炭化水素鎖の傾きを膜面上に投影したときの方向であり, 図2(e)で描かれているように y 軸からの角度 ϕ で表されるものである(以下では傾き方位角と表す). 図2(d)~(f)の模式図は二重層膜面への炭化水素鎖の投影図であり, 膜表面側の炭

図2. 温度 23.5°C における DMPC 自由膜の炭化水素鎖配列による回折パターン

(a) 湿度 80.4%, $L_{\beta F}$ 相

(b) 湿度 83.3%, $L_{\beta L}$ 相

(c) 湿度 85.9%, $L_{\beta I}$ 相.

(d)~(f) はそれぞれ (a)~(c) の回折パターンを説明する膜面の上から見た炭化水素鎖を示す. 膜表面側の炭化水素鎖の位置を黒丸で, 炭化水素鎖の末端までの投影図を点線で示している. 膜面に対して炭化水素鎖が傾いているため両者は異なった位置に描かれる. ϕ は炭化水素鎖の傾きの方位角である.

(G. S. Smith et al.: Phys. Rev. Lett., 60, 813 (1988) より)

化水素鎖の位置を黒丸で, 炭化水素鎖の末端までの投影図を点線で示してある. 膜面に対して炭化水素鎖が傾いているため, 上からみると両者は異なった位置になる. 図2(d)の $L_{\beta F}$ 相では ϕ は 0° , (e)の $L_{\beta L}$ 相では $\phi = 17.2^\circ$ と増大してゆき, (f)の $L_{\beta I}$ 相では $\phi = 30^\circ$ となり再近接の炭化水素鎖と同じ向きに傾く. (f)の場合, 反射面の一つは $\phi = 30^\circ$ の方向となり, 二重層膜面と垂直である. これは赤道上に強い回折ピークが表れることと一致している.

図1からわかるように温度 23.5°C で湿度を増加させると, $L_{\beta F}$, $L_{\beta L}$, $L_{\beta I}$ 各相をとる. このときの炭化水素鎖の傾き方位角 ϕ , 傾き角 θ , およびラメラ周期 d の変化を図3に示す. これは $L_{\beta F}$ - $L_{\beta I}$ 相転移が, ϕ が変化する過程であることを示しており, ϕ は温度によって変わることがわかる. 彼らはこの変化が極性基間の相互作用によるものであると推測している.

自由膜を用いて P_β 相のリップル構造による回折ピークも直接観測されており³⁾, その今後の発展が期待

図3. 温度 23.5°C における DMPC 自由膜のラメラ周期 d , 膜面に対する炭化水素鎖の傾き角 θ および炭化水素鎖の傾きの方位角 ϕ の湿度に対する変化
ここで $\Delta\mu = RT \times \ln(\text{相対湿度}/100)$ である. R は気体定数, T は温度である.
(G. S. Smith et al.: Phys. Rev. Lett., **60**, 813 (1988) より)

される.

3. 滴下法による配向膜

よく洗浄されたガラスやシリコンなどの基板にクロロホルム・メタノール 1:1 に溶かされた磷脂質を滴下すると薄くひろがり磷脂質のフィルムが作成される. 溶媒を蒸発させ, 湿度 100% の雰囲気下におくと, 磷脂質分子は二重層膜が折重なった多層膜ができる. このような膜では自発的に基板と二重層膜面が平行になり, 配向性のよい膜が形成される.

図4. 滴下法によって作成された DPPC 配向膜のラメラ周期の温度変化
湿度は 100% である.
(a) 2 成分のガウス関数による 4 次の回折ピークの再現結果. 白丸は強度の大きい成分の, 黒丸は強度の小さい成分のピーク位置を表す.
(b) 2 成分の correlated stacking model による 4 次の回折ピークの再現結果. 白のマークは強度の大きい成分の, 黒のマークは強度の小さい成分のピーク位置を表す. 3 つの純粋な成分は白丸 (61.54 Å), 三角 (58.9 Å), 四角 (56.9 Å) で表されており, それぞれの状態を表す多重層膜の模式図が挿入図に描かれている.
(M. Seul: Phys. Rev. Lett., **60**, 1150 (1988) より)

Seul らは米国の Stanford Synchrotron Radiation Laboratory (SSRL) 放射光源を用いて DPPC (ジパルミトイルホスファチジルコリン) 配向膜の, 湿度変化による脂質二重層膜間への水の吸収放出過程を調べた^{4, 5)}. 超高分解能を得るため X 線をトロイダル反射鏡によって集光したのち Si (111) 面によって単色化し, 回折光についてもさらに Ge (111) 面で単色化している. 試料には 30~40 層の二重層膜を含み, ラメラ周期による回折ピークが 12 次まで観測された.

彼らは最も強度の強い 4 次反射に着目し, これがピー

図5. 滴下法によって作成された DPPC 配向膜の湿度 0% の状態から水が二重層膜間に吸収される過程をラメラの 4 次反射によって観測している.

(M. Seul and P. Eisenberger : Phys. Rev. A 39, 4242 (1989) より)

ク位置の異なる 2 つのガウシアンで再現できることを示した。これはラメラ周期の異なる構造が共存していることを意味する。湿度 100% 条件下でのこれらのピーク位置の温度依存性を図 4 (a) に示す。ここで白丸は黒丸よりも強度の強い成分を表しており、温度上昇と共にそれぞれを結んだ折線が 42°C と 61.5°C の 2 箇所で交差している。彼らは、この交差する温度の前後では異なるラメラ周期の状態が共存すると考え、この交差温度に対応

する 2 つのラメラ周期の状態とラメラ周期の長いところにもう 1 つの状態があると解釈した。さらに, correlated stacking model⁶⁾ によって、各温度での回折ピークを 2 成分に分離した結果を図 4 (b) に示す。これより、3 種類のラメラ周期は 61.54 Å, 58.9 Å, 56.5 Å であり、これらの差は 2.5 Å になっている。これは水分子の大きさとほぼ等しい。したがって、膜間には水層が整数倍ずつ、いわば量子的に挿入されることが示唆される。この様子は図 4 (b) 中の模式図に描かれている。

図 5 には、湿度を増加させることによって水が二重層膜間に吸収される過程を示す。湿度 0%, 温度 32.2°C では 56.5 Å のピークおよびさらに水の少ない 54.1 Å の状態が共存しているが、湿度 100% 条件にし、32.2°C から 52.2°C に昇温すると次第に 54.1 Å 状態が 56.5 Å 状態に変化することが得られた。

以上のように水層が量子化される原因として、彼らは局所的に水層が厚い場合には、その部分だけ二重層膜に余分の曲げエネルギーを生じ不安定化するためであると解釈している。

配向膜の作製法としては滴下法他に、水面上に張られた単分子膜を基板にすくい上げて多重層膜をつくる方法、すなわちラングミュアー・プロジェクト (LB) 法がある。シンクロトロン放射光による実験ではないが、我々は名古屋大学超強力 X 線回折装置を用いて、下層液にカルシウムが存在下で作製された DPPA (ジパルミトイルホスファチジン酸) LB 膜の回折ピークを調べた⁷⁾。その結果、滴下法よりも LB 法の方が配向性の良い膜が作製されることがわかった。ただし、LB 法の難点は多重層膜を積層できる試料が限られていることであり、PC (ホスファチジルコリン) や PE (ホスファチジルエタノールアミン) には適用できない⁸⁾。

4. 単分子膜

有機溶媒に溶かされた磷脂質を静澄な水面上に静かに滴下したのち溶媒を蒸発させると、水面上に単分子膜が形成される。このとき、磷脂質分子のうち極性基は水の側を、炭化水素鎖は空気側に向こうとする。水面上に浮かせたテフロン板 (バリア) によって水面に平行な方向に表面圧を加えることによって分子は充填する。表面圧 π と一分子あたりの占有面積 A との関係、すなわち π - A 曲線からいくつかの相転移の存在が知られている。ま

図 6. さまざまな表面圧における DMPA 単分子膜の X 線回折ピーク
a から h にかけて表面圧は増加されており、挿入図の π -A 曲線上の a から h で示された表面圧に対応する。なお、 π_c 以上でゲル相が、 π_s 以上で固相が生成する。温度は 23°C、展開液は 10^{-2} M NaCl, $5 \cdot 10^{-5}$ M EDTA が用いられている。(C. A. Helm et al.: Biophys. J., 52, 381 (1987) より)

図 7. 単分子膜の X 線回折実験の配置図

SR はシンクロトロン放射光のビーム、 M_1 と M_2 は X 線を単色化のための結晶でゲルマニウムの (111) 反射面が用いられている。M は金でコートされたミラー、 $S_1 \sim S_3$ は可変スリット、D は NaI シンチレーションカウンタであり、 2θ 方向に回折がみられる。挿入図は試料部であり、B は可変バリアー、T はラングミュアートラフ、A は水深を浅くするためのガラス板である。(C. A. Helm et al. Biophys. J. 52, 381 (1987) より)

ず、希薄な状態から圧縮すると気体状態から液体状態へ転移する。図 6 の挿入図にはさらに圧縮したときの、DMPA (ジミリストイルホスファチジン酸) の π -A 曲線が描かれている。ここで表面圧 3~6 mN/m (π_s と表される) と表面圧 ~ 40 mN/m (π_c) で 2 つの相転移が観測されており、転移点でなにが起こるかについて問題となっていた。

まず、蛍光顕微鏡によって表面圧 π_c 以上では半径 10 μ m 程度の島状の暗い領域が観測された。これは液体相より高密度のゲル相領域であり、蛍光色素が液体相へはじきだされた結果暗く見えていると解釈されている。これより表面圧 π_c から π_s まではゲル相と液体相の共存領域であり、表面圧が増加するにつれてゲル相領域の面積が増大することがわかった⁹⁻¹¹⁾。

これらの相転移における分子配列を調べるために、X 線回折が有効であることは多くの人が考えるところであろう。しかし、対象は単分子膜であり、厚さはわずかに 25 Å 程度である。このような薄い膜の X 線回折が果たして可能なのであろうか？。これを実現させたのが放射光による高輝度の X 線回折実験である。

Helm らは西ドイツの Hamburg にある Deutsches

Elektronen Synchrotron (DESY) を用いて表面圧 π_c から π_s における X 線回折実験を行った⁹⁻¹¹⁾。装置の概要を図 7 に示す。単分子膜はトラフ (T) 中の水面に張られ、バリアー (B) によって表面圧が加えられる。また、水面が波立たないように A の部分にはガラスのプレートが沈められ、200~300 μm まで浅くしてある。SN 比を上げるためには、単分子膜からの散乱のみが観測されなければならない、X 線の浸透深さが単分子膜の厚さをわずかに越える程度にすることが望ましい。そのため、金でコートされたミラー (M) によって膜にすれすれに入射させている。このような注意深い配置を用いることによって、磷脂質分子の炭化水素鎖配列によるブラッグ反射が 2θ 方向に観測される。

図 7 は π_c 以上の各表面圧での X 線回折像を示す。まず、ゲル相領域が形成し始める π_c においてはピークはみられないが、表面圧増大にともなってピークが出現する。 π_c と π_s の間ではゲル相-液体相が共存するが、この領域では X 線回折ピークの積分強度と、蛍光顕微鏡測定から得られたゲル相領域の面積は比例する。したがって、このピークはゲル相に由来している。

表面圧 π_s を越える付近からピーク強度は急に増大し、40 mN/m 付近で格子定数は 4.163 Å まで減少する。また、ピークの線幅から求められる相関距離も、 π_s 以下では 10 格子分であったものが π_s を越える 86 格子分に増大する。これはゲル相よりも結晶的な固相の形成を示している。ところが、固相が形成されている状態で試料を回転させてもピーク強度は変化しない。これは観測している試料が単一結晶ではなく 2 次元的にランダムな配向をしていることを示している。

以上のように高輝度 X 線回折実験によって π_c と π_s における転移の特徴が明らかになってきた。

5. むすび

以上に述べてきたように、シンクロトロン放射光の輝

度を生かした時間分解測定、精密温度走査測定、および単分子膜等での注意深い測定によって、これまでと質的に異なる新しい知見が得られるようになってきた。将来は、さらに輝度の高い光源や、X 線レーザーの実現がなされることも考えられる。一方、それらを活用するためには温度ジャンプ技術など付随する技術の一層の開発が不可欠であろう。

参考文献

- 1) G. S. Smith, C. R. Safinya, D. Roux and N. A. Clark : Mol. Cryst. Liq. Cryst.: **144**, 235 (1987)
- 2) G. S. Smith, E. B. Sirota, C. R. Safinya and N. A. Clark : Phys. Rev. Lett., **60**, 813 (1988)
- 3) E. B. Sirota, G. S. Smith, C. R. Safinya, R. J. Plano and N. A. Clark : Science, **242**, 1406 (1988)
- 4) M. Seul : Phys. Rev. Lett., **60**, 1150 (1988)
- 5) M. Seul and P. Eisenberger : Phys. Rev. A **39**, 4242 (1989)
- 6) M. Seul and D. C. Torney : Acta Cryst., A **45**, 381 (1989)
- 7) S. Matuoka, H. Asami, I. Hatta, T. Ishii and K. Yoshikawa: Thin Solid Films, **127**, 123 (1989)
- 8) D.M. Taylor and M.G.B. Mahboubian-Jones : Thin Solid Films, **87**, 167 (1982)
- 9) C.A. Helm, H. Mohwald, K. Kjaer and J. Als-Nielsen : Biophys. J., **52**, 381 (1987)
- 10) K. Kjaer, J. Als-Nielsen, C.A. Helm P. Tippmann-Krayer and H. Möhwald : Thin Solid Film, **159**, 17 (1988)
- 11) K. Kjaer, J. Als-Nielsen, C. A. Helm, L. A. Helm, L. A. Laxhuber and H. Möhwald : Phys. Rev. Lett., **58**, 2224 (1987)

(受付 1990 年 7 月 9 日)