生体膜の相転移

核磁気共鳴法による研究

京 極 好 正

大阪大学蛋白質研究所 〒565 吹田市山田丘
昭和55年6月14日 第23回膜研究会 京都大学工学部にて講演

Phase Transition of Biomembranes —Studies by Nuclear Magnetic Resonance—

Yoshimasa Kyogoku

Institute for Protein Research, Osaka University, Suita 565

The phase transition temperature, fatty acids and phospholipids contents were measured for phospholipid vesicles prepared from a temperature sensitive mutant of unsaturated fatty acid auxotroph of *E. coli* K12. The transition temperature from the gel to liquid crystal states is closely related to the content of unsaturated fatty acids in phospholipids. This mutant grows at ordinal room temperature and also can grow at higher temperatures if some amounts of KCl, sucrose or glycerol are added to the culture medium. The role of these chemicals were investigated by measuring the stability for the osmotic pressure difference between the in- and outside of liposomes. KCl and sucrose are found to act as osmotic stabilizers but glycerol seems to play a different role.

Nmr works on biomembranes using deuterium and phosphorus magnetic resonances were reviewed.

ご紹介にあずかりました京極でございます。森島先生とは長い間のおつき合いです。今日は過分なご紹介をいただきまして、恐縮でございます。世話人の伊勢先生から、話題提供をということでしたので、私のところで手がけているいろんな仕事の中から、生体膜の相転移に関係した話題を紹介させていただきます。演題は核磁気共鳴法による研究となっておりますが、私どものところで行いました仕事は、必ずしも核磁気共鳴だけでなく、いろいろな方法を使っております。しかし世界における最近の核磁気共鳴を用いた膜の研究の発展はめざましいものがおります。私達のところは、やっと最近超伝導磁石核磁気共鳴装置が入ったばかりで、今日の話題の仕事にはそれを使ったというわけではございません。また最近では固体に近い状態のものへの高分解能 NMR の応用や、重水素、リンの NMR の生体膜系への応用ということも活発ですので、時間があればそういった研究の一端をも紹介させていただきます。

私自身は、最初は生体高分子としましては、核酸を対象としそれから蛋白質研究所へ移りましてからは、生理活性ペプチド、ヘムタンパク質をとりおげました。そういう核酸とかタンパク質というのは1個の高分子が非常にたくみな機能を発揮しているわけです。核酸の場合そのことは Watson-Crick のモデルとして表現されています。もちろん厳密に言えば、DNA の場合は2本の高分子の集合体かも知れません。酵素タンパク質なども、厳密に言う、サブユニットからなっていて、いわば集合体ですけれども、やはり1個の生体高分子として近似できる集団でもって、機能を発現しています。しかし生体膜というのは、これは非常に複雑な分子複合体であります。そして分子が集合しているということと、その動きとの間に、たくみな関係があるということに非常に興味があります。それは何も私だけでないに、生化学の分野の研究者も、個々の生体高分子の構造と機能に基盤を

Fig. 1 Singer-Nicolson の生体膜の模式図¹⁾

置きたいいわゆる分子生物学の次は、分子集合体に基盤を置く超分子生物学の発展を期待しているわけです。そういうようなことがありまして、私達も物理化学的に寄与できないかということで生体膜をとり上げましたけれども、私達のところで取り上げている膜は、大腸菌の膜です。Fig. 1 は、以前の膜研究会で生体膜の話題提供者が必ずといってよいほど示したと思われる生体膜モデルの図であります。このいわゆる Singer-Nicolson の生体膜モデルの意味していることは、基本的には生体膜の構造は脂質、おもにリン脂質からなっている二重層膜があってこの中にタンパク質が埋め込まれていて、そしてタンパク質やリン脂質の一部から、糖が毛のように生えているということでもあります。生体膜には、いろいろな働きがあるわけですが、先ず第1に、隔壁としての働きがあります。しかし、この隔壁は、非常に軟かく flexible であって、条件によって形を変えることが出来るというものです。それから第2に単なる隔壁でなく、選択的に物を透過させる働きをもっている壁であります。埋め込まれたタンパク質は酵素として働くものが多いわけですが、膜に埋め込まれているということはその酵素同志がお互いに作用し合って、働きやすくする場を提供しているという面があります。3次元的に、そういう酵素タンパクが分布しているよりは、2次元的な空間で制限されて相互作用する方がより確実な情報伝達が出来るという仕組みがあるわけです。これが第3の膜の効用です。それからこの壁というのは、いろんな顔を持っていて、特に表面にある糖というのは、どういう顔であるか、その識別を可能にする役割もしているわけであります。生体膜はこのようにいろんな機能を持っているわけですが、今回は一番基本的な脂質の二重層膜の持っている性質ということをお話させていただきます。

壁としての役割をはたしているのは、脂質が主であります。生体膜の中の脂質の挙動というものと、それから取り出した脂質の挙動というものとでは、厳密には同じ

Fig. 2 脂質小胞（ベジクル）の作り方

Fig. 3 ジバルミトイルレシチンのベジクルの ¹H-NMR スペクトル²⁾

ではありませんけれども、第1近似としては、生体膜の脂質のいろいろな性質というのは、取り出した場合においても保たれているということがわかっておりますので、物理的な性質はその抽出脂質のモデルで調べられています。大腸菌等を大量に培養致しまして、割合簡単に培養菌体からリン脂質を抽出することが出来ます。抽出したものを有機溶媒に溶かしまして、溶媒を飛ばし試験管の中の器壁につけている状態にし、そこへ水を入れていきますと、膨潤したサスペンションが出来ますが、それは白く濁っていてラメラ構造をもっています。しかしそういうものは、NMR の対象として難しいわけでした、普通核磁気共鳴の測定時にはそれを超音波で処理します。超音波をかけますとラメラ構造が破壊されて、小さなベジクルというものが出来ます。電子顕微鏡で見ますと、ベジクルは直径 250~800 Å 位の球形でありまして、壁の厚さが 50 Å くらいのリン脂質の二重層膜になっております。

こういうものを、NMR、この場合にはプロトンの NMR ですけれども、ある条件にして測定しますと、Fig. 3 のようなシグナルが見えます。リン脂質の構造は、こ

Fig. 4 ジパルミトイルレシチンの ^1H -NMR スペクトルの温度変化

の場合レシチンというリン脂質ですが負に帯電したリン酸基と正の荷電を持つトリメチルアミン基を持っています。そして、中ほどにグリセリン基がありまして、グリセリン基のところにアシル鎖、すなわち炭水素鎖で炭素数10~20位の長さのものが2本つながっています。模式的に表わす場合白丸が極性基の部分であり、2本の毛がアシル鎖を示しています。プロトンの核磁気共鳴を観察しますと、一番シャープに出るのはこのN末端のメチル基のシグナルです。それから炭化水素鎖のメチレン基と一番端のメチル基が次に鋭いピークとして観測できます。プロトンの数からしますと、メチレン基の方がはるかに多いのに、末端のメチル基の方がシャープに出て目立っているのは運動性の違いを反映しています。代表的な例として合成したレシチン分子の二重層膜のベジクルのNMRがどうなるか示します。これは、温度が低い時には非常に幅広く見えます。それがだんだん温度を上げていきますと、シグナルはシャープになってきます。それでこの線の幅、すなわち半値幅を一つの指標としまして、プロットしていきますと、温度が上りますと徐々にせまくなってくる、そしてある温度で急激にせまくなることが起こります。これが急に変化するという事は分子間でコペラティブな現象が起こっているということでありまして、そこが相転移点に相当するところであります。この相転移点というものを調べる方法はいろいろあるわけですが、核磁気共鳴の線幅というものをプロットしていきまして、相転移点というものをみつける

Fig. 5 分子の運動性と緩和時間、線幅の関係

Fig. 6 脂質炭化水素鎖のゲル相-液晶相間の相転移³⁾

ことが出来るということです。

メチル基のシグナルが非常にシャープで、それからメチレン基のシグナルは温度が低い時には見えにくい幅広くて、温度が高くなる時には線幅が鋭くなるということは何を反映しているかと言いますと、これは観測しているプロトンの所属している近傍のセグメントが、いかに運動しやすいかということを表わしています。これがシャープであるということは、その個所はよく動いているということです。ある温度で、ベジクルの大きさに急に差異が生じるということはほとんどありませんので、線幅が温度によってシャープになるということは、温度を上げるに従って、リン脂質分子の運動が激しくなる。あるいはもっと局所的にリン脂質分子中の測定しているメチレン基部分の運動が激しくなることを示しております。もっとNMR的ないい方をしますとこの線幅がシャープであるということは、その部分のプロトンの緩和時間が長いということです。逆に幅が広い時には短いわけですが、この緩和時間を規定しているのはお互いに相互作用しているプロトン同志の空間的な距離と、それから磁場方向に対する相互作用の軸のなす角がどうい

Fig. 7 大腸菌温度感受性変異株から抽出したリン脂質より作ったベジクルの ^1H -NMR スペクトル⁴⁾

PL 28: 28°C で培養した菌のリン脂質

PL 42: KCl 存在下 42°C で培養した菌体の脂質

ふうな速さで揺動しているかということです。今のところはプロトン間の距離というものはいったい一定であるとしめると、その揺動運動のしやすさというもの線幅に反映されていて、その運動のしやすさというものはその local viscosity といいかえることもできます。

さて、この相転移というのは、よく知られていることですけれども一応説明しておきますと、NMR の線幅が非常に幅広い時はこの炭化水素鎖が規則的に配列して結晶状になっている状態に対応し、ゲル状態といわれます。これが温度を上げていきますと、炭化水素鎖の配列が乱れる。しかし縦方向のくり返し、すなわち、二重層膜の存在は壊れず保たれています。ですから、これは完全な液体状態との中間にあたり、液晶状態になっているといわれます。膜面に平行な方向に関しましては、これはゲル状態では細密充填をしています。相転移点の上では長距離的に繰返しは乱れ、その平面の中でのリン脂質の動きは速くなっていきます。こういうふうな分子の繰返し、配列問題は、むしろX線の回折の研究から見られると思います。

私達がやっております大腸菌の膜というのは、野性株、*E. Coli* K12 の変異株で不飽和脂肪酸要求性の温度感受性変異株 UFA^{ts} というものです。これは飽和脂肪酸の飽和度を規定する生合成機構が温度感受性になっておりまして、高温で培養するとその切替えが起こり飽和脂

Table 1 大腸菌リン脂質の脂肪酸組成⁴⁾, %

脂肪酸	PL 28	PL 42 (KCl)
12:0	1.26	1.50
14:0	2.86	36.17
14:1	1.56	3.73
16:0	41.27	53.45
16:1 + 17:1	31.68	3.11
18:1 + 19:1	21.39	2.04
全不飽和脂肪酸量	54.63	8.88

肪酸の量を制限して合成する菌です。ですから、普通大腸菌というのは、これは人間の体温くらいでないと生きませんし、また、多少体温より高温、低温で生きさせようとしめると、その培地にいろんな飽和脂肪酸や不飽和脂肪酸を入れてやってそれを取り込ませて補って始めて成育が出来るわけです。しかしこの UFA^{ts} の場合は、温度を変えることによりまして、適応が起こり非常に幅広い温度中で生育することが出来まして、60°C 近いところまで生きることが出来ます。ただ、その時には培地の方に osmotic stabilizer と称せられるものをかなり入れます。その osmotic stabilizer というのは KCl とか、sucrose で、それを培地に数%入れてやります。それからグリセリンを入れてやってもその役割をします。グリセリンは本当にこういうところでは、osmotic stabilizer

として働いているかということは、疑問点があるわけですが、少なくともこういうものを入れてやりますと現象的には高温で生きるわけです。変異株の菌を培養致しまして、菌体の脂肪酸組成を調べてみますと、Table 1 のようになります。PL28 とは 28°C で培養した菌のリン脂質ということで、また PL42 (KCl) は 42°C で培地に KCl を存在させて培養した菌のリン脂質という意味です。比較しますと、明らかにこの脂肪酸組成に変化が生じています。12:0 という表記は、炭化水素鎖の炭素数が12個であり、そして不飽和度が0の脂肪酸という意味であります。Δはシクロプロパンの記号で、これを普通不飽和度と同じような数として数えます。そうしますと、不飽和脂肪酸の量プラスシクロプロパンの数を不飽和度の目安とすれば、PL28 と PL42 (KCl) で不飽和度が圧倒的に違うという結果になっています。低温で培養したものに関しましては、不飽和度が非常に高く、高温で生きる時には、飽和脂肪酸の量が増えていくということになります。

Fig. 7 の左は常温で培養した場合のプロトンの NMR で、先ほどと同じように説明しますと、PL28 の方はかなり低温でもはっきりシグナルが見えております。PL42

Fig. 8 PL 28 (28°C で培養した菌体のリン脂質) ベジクルの ^1H -NMR の線幅 (白丸) と共鳴線の高さ (黒丸) の温度変化⁴⁾

Fig. 9 PL 42 (KCl) (42°C で KCl 存在下培養した菌体のリン脂質) ベジクルの ^1H -NMR の線幅 (白丸) と共鳴線の高さ (黒丸) の温度変化⁴⁾

(KCl) の方は温度が低い時は S/N を考えても、シグナルはあまり出てない。これは定性的に見しても、同じ温度でも PL28 の方の脂肪酸鎖の方が運動性が高く、PL42 の方がかなり抑えられていることを示しています。この温度変化をみまして、先ほどのような線幅のプロットしていきます (白丸) と、Fig. 8 のようになります。これは、スケールがよくないためあまりはっきりしませんが、この 20° よりちょっと下のところで1つの折れ曲り点があります。それからシグナルの高さの方 (黒丸) にいきますと、15° と 20°C 前に折れ曲りが見えています。すなわち 17~18°C で相転移が起こっています。高温で培養したものでは、これに関しましてはちょっと複雑になりまして、Fig. 9 の線幅のプロット (白丸) は 17°C 付近から変化が起こり出しまして、40°C へんから急に落ちてきます。両温度の間におきまして、徐々に線幅の変化するおる状態が存在しています。シグナルの高さ (黒丸の方ですけれども) は 17° 付近の変化というのは非常に小さくはつきり出ませんけれども、40°C 付近の所は大きな変化があります。リン脂質の主な部分というのは、40°C で相転移を起こしておりますけれども、

Fig. 10 PL42 (KCl) ラメラ状態の示差熱分析曲線⁵⁾

Fig. 11 PL42 (KCl) ラメラの 1410 cm^{-1} における赤外線吸収強度⁵⁾

17°C 付近から 1 部のリン脂質分子に相転移が始まり、17°C と 40°C の間では相分離状態が起こっていることを NMR の結果は示しています。

この相転移点を調べるのには必ずしも NMR の線幅ということだけではないに、他の方法も検討してみました。NMR 測定の欠点は測定に線幅がひっかかるようにするため超音波処理をしてベジクルの状態にしなければいけないということです。温和な条件で作ったラメラ構造では、非常に線幅が広く NMR で観測しにくいので超音波処理をするのですが、その超音波処理で外からのかなりの力を加えているということがなんらかの状態を変えているのではないかと心配があります。実際に筋小胞体膜について超音波をかけた時には、変化が生じ

Fig. 12 単分子膜における分子占有面積と脂肪酸の構造との対応⁶⁾
上：飽和脂肪酸鎖の場合
中：長さの違う飽和脂肪酸鎖の場合
下：不飽和脂肪酸鎖を含む場合

ていることがあります。Fig.9 は、PL42 について、超音波処理しないでラメラ状態のまま示差熱分析でみたものです。そうすると、やはり熱の吸収、放出のところがありまして、下の方というのは 15°C くらいに始まりまして、上のところは 40° 位のへんに強いピークが生じることが起こっております。ですから、示差熱分析という別の手段で見ましても、本質的には先ほどの NMR の線幅で見たのと変わっていないことがわかりました。この場合には、超音波かけることが相転移点に対して影響していないようです。また相転移ということは炭化水素鎖の秩序性の変化を意味し、NMR から言えばその運動性の違いを反映しているのですが、これはミクロにみますと、炭化水素鎖の C-C 結合が全部トランスであったものが、無秩序のコンホメーションをとるようになる。これを 1 つ 1 つの結合からみますとゴーシュが混ってくることとなる。すなわちトランスとゴーシュ形の分布が生じてきていることになります。それで、赤外吸収のそういうトランスとか、ゴーシュに敏感な炭化水素鎖に由来する振動の吸収強度の相対比が違ってきます。Fig. 11 は PL42 のラメラについてトランス形に敏感なメチレン基の吸収強度をコンホメーションに敏感でない末端メチル基のはさみ振動の強度にノーマライズしたものをプロットしたものです。これを見ましてもトランス

Fig. 13 飽和脂肪酸リン脂質と不飽和脂肪酸リン脂質を含む系の相図⁷⁾
 DPPC: ジパルミトイルホスファチジルコリン
 DEPC: ジェラリジルホスファチジルコリン
 F: 液晶相
 S: ゲル相

形がくずれるということがやはり 40°C 付近で協調的に起こっています。ですから、今言った3つの方法の、いずれをみましても炭化水素鎖の大部分というのは、40°C 付近で相転移点を示しております。

28°C で培養したものは不飽和脂肪酸の量が多く、それから 42°C で培養したものでは不飽和脂肪酸の量がうんと減って、飽和脂肪酸の量が多くなっているということと、相転移温度とは相関があるということは先に述べました。いろんな研究が既にされておりますが、その化学的な意味の説明というのは、飽和脂肪酸の量が多くなりますと、密にパックすることが出来る一方、不飽和脂肪酸、特にシス型の二重結合が入ることによりまして、そこで炭化水素鎖が曲ることになる。そうすると、分子同志近づくことが出来なくなって分子間相互作用が弱くなる。そういう意味では、熱に対して低い温度で乱れが生じるようになる、と説明されています。そういうことは厳密には単分子膜の実験で、分子占有面積の測定から対応関係が調べられております (Fig. 12)。

42°C で培養したものの NMR の線幅のプロットは、単純な1つの折れ曲りじゃなしにずらずと変化したということはいわゆる相分離の状態という中間状態の存在を示していたわけです。実際の生体膜ではいろいろな脂肪酸が共存しているわけですが、大体の傾向として飽和脂肪酸の成分と、不飽和脂肪酸の成分というのに分けます。飽和脂肪酸 (たとえばジパルミトイルホス

Table 2 大腸菌の生育温度と相転移点 (T_c) の関係⁸⁾

成長温度	T_c	加えたりん脂質の脂肪酸の構造
28°C	25~55°C	18 : 0
22	20~50	16 : 0
20	18~45	none
16	18~42	18 : 0 iso
10	5~32	18 : 1 trans
8	0~15	17 : 0

ファチジルコリン) のみというのは Fig. 13 右側の軸上に対応し転移点が 40°C であり、左側の不飽和脂肪酸 (たとえばジェラリジルホスファチジルコリン) に対する方は転移点が低く 12°C であるとして、それが混ざっているような場合には、たとえば 1 : 1 の時その混合比のところで温度を上げていきますと、12°C 以下では両者が混じりあったまま固体状態で存在し、10数度で不飽和脂肪酸の部分が液晶的になり出し、32°C 付近までは液晶、ゲル相が共存していることになります。こういう相分離の状態というのは京大生物物理の大西先生などが ESR でよく調べられております。われわれの用いた大腸菌の変異株というのは、自分自身で飽和脂肪酸の量を、生きるための条件に合わせてコントロールしているわけで、高温で培養されるとその量を増してその転移点を自分で上げているわけです。生育温度に対して、非常に転移点が低いということは機械的にも弱くてまずいことが起こるのではないのでしょうか。逆に低温で生きようとするものは、不飽和脂肪酸の量を増して転移点を成育温度よりも下げようとしている。普通の大腸菌ですとそういうことを行わせるのには、これは培地の方にこういう飽和脂肪酸や不飽和脂肪酸を入れてやりまして、とり込ませ相転移の温度をコントロールしてやります。Table 2 は私共のデータではありませんが、そういう関係を示したものです。そういうふうにしますと、生きていく条件と相転移点というのは相関がありまして、低温から温度を上げて行って相転移点が始まるその温度より少し上のところに生育できる条件があるようです。至適な成育条件というのは、全くのゲル状態というのはほとんど不可能です。だいたいゲル相-液晶相の共存状態のようなところ、それからあるいは全く液体のような状態、こういうところが成育条件になっております。ですから外的な環境が違いますと、それに合わせて脂肪酸の組成を変え条件に合わせて生き延びています。では液晶相があるとどういふ点が良いのでしょうか。Fig. 14 は 42°C で KCl 存在下

Fig. 14 大腸菌温度感受性変異株 (42°C で KCl 存在下培養したもの) におけるの β -ガラクトースの膜透過速度⁵⁾

Fig. 15 大腸菌温度感受性変異株の温度に対する適応の様子 (阿久津秀雄, 赤松穰未発表)

で培養した菌そのものを使って、 β ガラクトースが膜を透過する速度を温度を変えて調べたものです。そうすると、これは温度が低いところだと温度による速度の変化が大きい。すなわち、透過活性化エネルギーが大きい。20°C の転移点を過ぎますと、これは下の方の転移点ですけれども、相分離状態になります。そこまでいきますと、活性化エネルギーは小さくなる。すなわち透過しやすいということが言える、その変化する温度がだいたい 20° くらいで相転移の始る所に対応します。それでは 40° 付近の主たる転移点ではどうなるかということは興味あるのですが、生化学的に、こういう高温で活性を測るとするのは非常にむづかしくなりました、測定してありません。また、菌体分裂に対する温度の影響というもあります。これも、42°C で培養した培養液の温度を急に下げていきまして、そしてどういふふうな状態になっていくかを見ます。予想されることですが、42°C で培養されているものを急に温度を下げますと、例えば 25° に下げますと、菌体の分裂は起こりません。これは濁度の測定に示されています (Fig. 15)。濁度が平衡にあるということは菌体が増えていかないことを意味し、濁度が増加すると菌体が増えているのです。数時間経ちますと、だんだん分裂が起こり出すのは、その間に適応が起こり、脂質の分析をしてみたら、多分不飽和脂肪酸の量が多くなっていると思いますが、そういう性質を獲得したもののみが増えるわけです。これを今度は人工的に促進させようとしめると、不飽和脂肪酸、たとえばオレイン酸を培地に入れてやりますと、急速に菌体の増加が始まります。これは自分達で造るよりは外から獲得した方が手取りばやいからでしょう。そして、不飽和脂肪酸を取り込みまして、膜の性質をゲルの状態から液晶の状態にもっていくことができれば分裂が促進されるのでしよう。そういうことを想定させるグラフであります。

さて、先ほどの菌体が高温で育成するには、osmotic stabilizer と称せられるものが必要であるということを

Table 3 リポソームの体積 (V), グルコース濃度 (C) 450nm の光の散乱強度 (A_{450}) の関係⁹⁾

$$V = \left(K \frac{C_{in}}{C_{out}} + V_{LP} \right) \dots \dots \dots 1)$$

$$V = \frac{k}{A_{450}} \dots \dots \dots 2)$$

$$\frac{1}{A_{450}} = \frac{1}{k} \left(K \frac{C_{in}}{C_{out}} + V_{LP} \right) \dots \dots \dots 3)$$

V_{LP} : 脂質の占める体積. k, K : 比例定数

Fig. 16 ベジクル中にグルコースを閉じこめて、濃度差を作った場合

申しました。ただ、単に飽和脂肪酸の量が増えているということだけでは、まだ成育には欠ける要素があります。それでは何故 osmotic stabilizer というものがないと菌体が安定に存在しないか、を説明しないといけません。そこでこういうベジクルというのは、浸透圧的に安定かどうかと言う問題を調べてみました。方法としましては、古典的な基本的な方法があります。これはグルコースをベジクルの内と外に入れて濃度勾配を造ります (Fig. 16)。濃度勾配を造るというのは、グルコースの、50 m mol なら 50 m mol 溶液 の中にリン脂質を入れて、超音波処理して、ベジクルをつくりますと、内と外のグルコース濃度は同じですが、そういう状態で透析してやるとか、ろ過しますと外側の溶媒は入れ替るので、外側のグルコースの濃度は減少しますが、内側のグルコースは透過しませんのでベジクルの内外でグルコースの濃度勾配ができる。そうすると外から水が入ろうとして内から浸透圧がかかる。そういう条件をつくります。また、逆に外側にグルコースを加えれば、外から圧力がかかることになります。そういう濃度勾配を造ってやりますと、水が入りするので、そのベジクルのサイズも膨張したり収縮していきますから、この浸透圧に従いまして、すなわち Table 3 の濃度比 C_{in}/C_{out} 比に従いまして、ベジクルの体積は変化していきます。この関係は定性的には1次の比例関係になります。濃度比に比例しない項がありますが、これはリン脂質自身の体積に対応する量です。ではベジクルの体積を何で測るかと言いますと、これは簡単に濁度で測定出来ます。2式はベジクルの体積と濁度の関係ですけれども、Banhams が経験的に認めたベジクルが小さくなるほど散乱が大きくなるという現象があります。この関係は散乱する光の波長と粒子の大きさ、屈折率によってある範囲で成立するのですが、ミーの散乱式から導出されます。ですから、両方の関係式をつなげば3式のようになり、濁度をプロットしてやれば、ベジクルの体積の変化が追いかけるれます。

Fig. 17 ベジクル内外にグルコースの濃度差を作った時の濁度の変化¹⁰⁾
 PL28: 28°C で培養した場合
 PL42 (KCl): KCl 存在下 42°C で培養した菌体のリン脂質ベジクル

Fig. 17 は、そういうプロットですけれども、28°C で培養した菌に対しては (上図)、かなり広い濃度差の範囲で一次の直線関係にあります。横軸の1というのは、内と外のグルコースの濃度が等しいこと、1より小さい時というのは外側の濃度が高い状態、1より大きいところは内の方がグルコース濃度が高いところですが、したがってこれは4倍位まで内側のグルコース濃度が高いところまでベジクルが膨潤してふくらんでいくけれども、それから先は多分破裂してしまうのでしょう。しかし、一方 KCl 存在下 42° で培養したものについて同様のことを測定してみますと (下図)、これは非常に濃度差の範囲が狭いところでしか安定に存在しません。直線の部分は0.6~0.7の間だけです。これは1より小さいわけですから、外側から浸透圧がかかっているような状態ではないと安定に存在しないことを意味します。これ以外のところではベジクルに孔があいていてくっついたりこわれたりすることが起こっているようです。Fig. 18 の上はショ糖を入れて 42°C で培養した菌体からとり出したリン脂質をベジクルについて測定したものです。これも内外のグルコースの濃度比が1より小さい時、すなわち

Fig. 18 ベジクル内外にグルコースの濃度差を作った時の濁度の変化¹¹⁾
 PL42 (Sucrose): ショ糖存在下 42°C で培養した菌体のリン脂質ベジクル
 PL42 (glycerol): グリセリン存在下で培養した菌体の脂質ベジクル

外部のグルコースの濃度が高い時でないと安定に存在しません。この間ですと、濃度とグルコース濃度比の間に割合に直線的な関係がある。しかし内側のグルコースの濃度が高くなってくるとすぐパンクしてしまう。菌体中にはいろいろなものが溶けていますから、菌体外の培養液に何も溶けていなければ溶解物質の濃度比は1より大きくなり、パンクすることが予想されます。そうしてみますと、KCl かショ糖を培養の時あたえたということは、菌体の外側にそういうものが存在することによって濃度比を1より小さい領域にベジクルを保ち、膜をパンクさせないために必要であったということになります。そういう意味ではショ糖や KCl が、osmotic stabilizer と言われて妥当であります。ではグリセリンも osmotic stabilizer かということは実は疑問であります。これはグリセリンというのは、膜を透過すると言われております。グリセリンを培地に入れて 42°C で培養した菌体脂質ベジクルについて同様のことをしらべてみますと、Fig. 18 の下のようになり、これは常温で培養したもの

Table 4 大腸菌リン脂質の組成⁴⁾

大腸菌のリン脂質	CL (%)	PE (%)	PG (%)	Lyso-PE (%)
PL 28	4.1	78.3	11.3	6.2
PL 42 (2% KCl)	15.7	79.8	4.5	—
PL 42 (15% Sucrose)	8.5	90.2	1.3	—
PL 42 (9.5% Glycerol)	6.5	80.1	13.4	—

CL: カルジオリピン

PE: ホスファチジルエタノールアミン

PG: ホスファチジルグリセロール

lyso-PE: リゾホスファチジルエタノールアミン

Fig. 19 各種リン脂質の構造
 PE: ホスファチジルエタノールアミン
 PG: ホスファチジルグリセロール
 CL: カルジオリピン

(PL28) と同じようになります。外側の濃度に比べて、内側グルコース濃度がかなり高い範囲までも、かなり安定にふくらんでいっていることがわかります。ですから、グルコースを入れて培養した菌体はショ糖や KCl を入れて培養した菌体とは違った挙動を示しています。グルコースも osmotic stabilizer と言われておりましたけれども、その原因というのはどうも以下に述べますよう別のところにあるようです。

先ほどの表は炭化水素の飽和度でみていただきましたが、Table 4 はリン脂質の組成からみたものです。つまりリン脂質の組成というのは極性基の違いでありまして、大腸菌のリン脂質はホスファチジルエタノールアミン (PE) というのが圧倒的に多く含まれています。ですが、ホスファチジルグリセロール (PG)、カルジオリピン (CL) というものでだいたい 100% です。4 種の培養条件の違

ったものでホスファチジルエタノールアミンが主成分であるということとは変わらないのですけれども、ホスファチジルグリセロールの量、カルジオリピンの量というのは変わってきています。浸透圧に対する安定性にホスファチジルグリセリンの量というのがかなり決め手になっているのではなからうかというのは、28° で培養したものと、グリセロールを入れて培養したものとは、ホスファチジルグリセロールの量はほとんど変わらないということで推定されます。主成分であるホスファチジルエタノールアミンというのは Fig. 19 に示された構造をしています。ホスファチジルグリセロールというのは、このリン酸基にアミンでなく、もう1つグリセリンがくっついていて、カルジオリピンというのはグリセロールを介して2分子くっついたような型をとっています。ホスファチジルエタノールアミンというのは中性リン脂質ですが、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピンは酸性リン脂質であり、非常に親水性の高いものです。こういうホスファチジルグリセロールはどうやらホスファチジルエタノールアミンの間で糊のような役割をしていてベジクルに粘着力を与えているようです。Fig. 20 はある濃度のグルコースを閉じ込めたベジクルの外液に、等モルの KCl やグリセリンを入れて、ベジクルサイズの変化を経時的に追跡したものです。KCl とグルコースの場合、ベジクルサイズに変化ありませんが、グリセリンと水の場合はベジクルが大きくなっています。グリセリンは実際に膜を透過し、KCl、グルコースは透過しないことを意味し、ですから塩や糖はやはり osmotic stabilizer であるが、グリセリンはそうでないということになります。それで、どうもホスファチジルグリセロールというものの役割が、膜の安定性に重要ならしいという

Fig. 20 ベジクル内外に濃度差を作った時のベジクルの体積変化の時間経過⁽¹⁰⁾

Table 5 28°C で培養した大腸菌変異株から分離した脂質から構成したりポゾームの相転移点

	混合比	T _c (NMR)
PE: CL	9 : 1	19.5°C
	8 : 2	18.5
	7 : 3	18.5
PE: PG	8 : 2	17.7
	7 : 3	19.3

ので、私達はそういうリン脂質をエタノールアミンとか、カルジオリピンとか、グリセロールとか成分に分けてから、今度はいろいろな量比で混ぜてみてベジクルをつくり、それに対する安定性を調べてみて、本当にホスファチジルグリセロールが必要かどうかみてみました (Table 5)。確かにホスファチジルエタノールアミンだけですとこれはベジクルは出来ませんが、グリセリンを 20~30 %入れてやりますと、非常に安定になります。これより量が減りますとベジクルが安定でなくなります。相転移点自身はホスファチジルグリセロールの量によってあまり変わりません。この膜の安定性ということと相転移ということは、直接の結びつきはありません。やはり相転移点に寄与する主な原因というのは、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸の分量でありますし、膜が安定にベジクルを造るかどうかということは、その中における酸性リン脂質特にホスファチジルグリセロールの存在というものが大きいようです。大腸菌の温度感受性の変異株では温度の変化に対しましては、分裂とか酵素の働きを有利するために脂肪酸の飽和度をコントロールするという機能が働く。しかしそれはまたリン脂質の組成変化につながり、培養条件に対して生存するためには外部的に osmotic stabilizer の存在を要求させざるを得なくなったようです。ではグリセロールが何故安定化剤として役立つのかということですがこれはホスファチジルグリセロールの生合成に役立ったのではないかと思います。

以上がわれわれのところの仕事を中心としたお話してありますが、その仕事は国立予防衛生研究所の赤松穰博士のご協力をいただき、当研究室の阿久津、吉川が中心となって行ってきたものであります。

さて本日は NMR による膜の研究という題での話ですけれども、必ずしもプロトン NMR の線幅が、相転移点をチェックするには一番よい方法とは思えません。最初に申しましたように、超音波処理をしてベジクルを

Fig. 21 重水素 NMR に見られる共鳴線の分裂¹²⁾

Fig. 22 重水素 NMR で求めたレシチンラメラにおける炭化水素鎖の各個所におけるオーダーパラメータ¹³⁾

●印: 30° ■印: 55°
▲印: ESR で求めた オーダーパラメータ

作らないとプロトン NMR の線幅の問題はひっかかってきませんが、その処理の結果系に変化が生じる場合も考えられます。また今回のわれわれの研究の結果のようにリン脂質各成分の役割が重要になってきますと、各々の成分が膜の中でどういう挙動をとっているかということを見たいくなります。そうすると特定な成分を NMR 的にラベルして、その挙動を比較するということが行いたくなります。そういう時には重水素の NMR, それからリンの NMR ということが注目されてきます。それらについて、少し紹介させていただきます。重水素の NMR は世界ではカナダの NRC のスミス博士等のグループ、それからスイスバーセル大、バイオセントルムのゼーリック教授のグループ、日本ではがんセンターの斎藤肇博士がやっておられます。重水素というのはこれはプロトンと違いまして、核スピンの 1 でありますので、電気的な四極子を持っている。そのために四極子と磁場との相互作用で、核四極子分裂ということが生じる。そのためにこのようなダブルレットパターンが与えられます (Fig. 21)。このダブルレットはプロトン NMR の線幅のオーダーではありませんで、数 10 キロヘルツにもなります。そしてこの間隔というものが、膜の秩序性を示す目安となります。間隔は電場勾配が磁場に対してなす角度

Fig. 23 全重水素化パルミチン酸を含む培地で培養した大腸菌外膜の 34.4MHz における重水素 NMR¹⁴⁾

によってきまっていますが、電場勾配は C-D は結合に沿っていると考えると、配向膜の磁場に対する角度をいろいろ変えることによりまして、この間隔が変わって来ます。膜のような場合には、C-D 結合のついたリン脂質分子は膜平面に対してある角度を持った軸のまわりに対称的な配列をしていると考えます。それと同時に、今度は C-D 結合というものが、リン脂質分子のそういう回転軸に対してどういう角度をなして分布しているということがダブルレットの間隔と結びつけることが出来、秩序性を示すオーダーパラメータ S_{CD} という値を算出してやる事が出来ます。例えばリン脂質のアシル鎖の末端のメチル基だけ重水素にする、それから、その次は 2 番目のメチレン基を重水素化するという風にいろんな個所を重水素化しまして、そして先程みたいな核四極子分裂の程度を測って、それからオーダーパラメータを出してみます。このオーダーパラメータを ESR のスピンラベルの実験から得られるオーダーパラメータと同じものに換算しますと、1 の時が 1 番秩序性が高いということになります。Fig. 22 はこのように局所的に重水素化したステアリン酸を卵黄レシチンのラメラの中に埋めて測定したオーダーパラメータの値です。そうしますと、根元に近い所が 1 番秩序性が高く、そして炭化水素鎖の末端に行くほどこの分裂は小さくなりディスオーダーになって行く、という結果です。温度の上昇によって秩序性が落ち根元に近いところまで無秩序性が拡って行きます。ESR のスピンラベルで求められたオーダーパラメータ

Fig. 24 種々の膜系における 129MHz の ^{31}P -NMR スペクトル¹⁵⁾

- A: リポソーム (ラメラ)
 B: 配向多重層膜
 C: 超音波処理したリポソーム (ベジクル)
 D: ヘキサゴナルな配列をしたリン脂質ミセル¹⁶⁾

と傾向は合っているけれども値は違います。スピンラベルという方法ではプローブが入っているための影響があるのかも知れません。こういう測定をするには鍵となる位置に重水素をラベルしたものを合成しなければなりません。それに対してモーメントの方法というのがあります。この方法にはまず全てを重水素化した試料を培地の中に入れてそれを取り込ませる、それから取り出したものの重水素NMRを測ります。Fig. 23は大腸菌の外膜の全てのリン脂質をラベルしたもののスペクトルです。そうすると温度が低い時には、10.0 KHzの幅もある非常にオーダーの高い成分があります。温度が高くなってきますとディスオーダーになってくるのですが、完全なディスオーダーになると、真中の1本線になりますけれども、そうではなしにある程度のオーダーのあるものが存在し

ています。この形をモーメントの方法で理論値を対応させてやはり秩序性の程度を知ることができます。37°Cでは先ほどのオーダーパラメータに換算しますと、0.26くらいに相当します。中央の鋭いシグナルを与える部分は末端のメチル基ですが、このところは、かなりディスオーダーになっているのでしょう。ですからこれは相分離にある状態に対応しているのではないかということを示しています。

それから、もう1つはリン酸のNMRです。リンのNMRからはベジクルがどういう形であるかという情報を得ようという試みがさかんです。リンのNMRでは配向した試料の共鳴点を測定すると、磁場に対する角度によりましてシグナルの位置が変わってきます。これはリン核のまわりのしゃへい定数のテンソルに異方性があることによります。リン酸の分子が磁場に対してどう向くかということでシールドのされ方が違い、共鳴点が違うことになります。ですからFig. 24 bのように配向した膜の角度に依存して共鳴する位置が違うということは理解されるでしょう。aのようなラメラ状態になっていますと、これは粉末と同じような傾向が出てきます。ラメラ中でリン酸基を持つ分子が速い速度でいききしているわけではないので空間的には粉末と同じように分布しているということで、角度依存をする共鳴線の位置に分布関数をかけると、こういう吸収形になります。こういうパターンを示す時には、これはいわゆるラメラ状態を示すパウダーパターンと言います。しかし、温度を上げてやるとリン脂質分子が非常によく動くようになってきたり、それからベジクルのサイズが大変小さくなったりしますと、リン脂質分子の運動性が高まりcのようなシャープなシグナルになります。これは等方的な速い運動の存在が、小さいベジクルの存在を示しています。dはヘキサゴナルな状態を示すパターンといわれるものです。例えば脂質が二重層膜でなしに、シリンダー状になったような時にヘキサゴナルな状態といわれます。ですから先ほどのaのパターンかdのパターンか、それからシャープな1本かという、だいたいその3つが、リン脂質の集合状態を示す目安として用いられています。こういう話をどんどんエスカレートしていきますと、だんだん大胆なことも言われだします。これは大腸菌膜そのものとそれからとり出した脂質の分散系について ^{31}P NMRを測定したもので、両者とも温度の低い時にはラメラ状態ですが、抽出リン脂質の二重層膜の方は温度を上げていきますと等方的なパターンになりますが、大腸菌の膜そのもので

Fig. 25 左側：大腸菌 K-12 から抽出した全リン脂質を分散して得たベジクルの36.4MHz の ^{31}P -NMR
右側：大腸菌 K-12 細胞膜を分散したものの ^{31}P -NMR¹⁷⁾

は、高温でヘキサゴナルな配置になるという解釈です。今度はコレステロールを加えた時と加えない時でラメラ状態の、リン酸基部の秩序性をリン酸のシグナルの幅からみたものです。非対称的なシグナルの端から端までの幅が秩序性を示すパラメータになります。これによりまずコレステロールの存在しない低温の時は高い秩序性がある。あるいはラメラ部分の拡りが速くまで及んでいるが、コレステロールが入るとその範囲で狭くなり、これは温度でも変わらないことを示しています。重水素やリン酸の NMR の扱い方もだんだん生化学的になっております。こういう実験はこれまで私達のところではやっておりませんでしたから批判も加えず紹介したわけですが、NMR は確かに1つの手法としましてもいろいろ面白い応用があり、また得られる情報量も多いので NMR を使って膜の状態を研究することは、今後もいろいろな形で行われるのではないかと思います。

本日はどうもご静聴ありがとうございました。

Fig. 26 リン脂質リソソームの ^{31}P 化学シフトテンソル値の異方性の温度変化¹⁸⁾
コレステロール共存下と非共存下における比較

○印：リン脂質のみ

●印：1 : 1 リン脂質，コレステロール混合物

DPPC：ジパルミトイルレシチン

DPPE：ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン

引用文献

- 1) S. J. Singer: Cell Membranes (G. Weissmann, and R. Claiborne ed.) p. 37, HP Publishing Co., New York (1975)
- 2) 甲斐荘正恒: NMR の生化学への応用 (赤坂, 飯塚, 京極, 森島編, 化学増刊 67, p. 137, 化学同人, 京都(1976))
- 3) 岩柳茂夫, 松浦嘉彦: 生物物理, **15**, 12 (1975)
- 4) K. Uehara, H. Akutsu, Y. Kyogoku, Y. Akamatsu: *Biochim. Biophys. Acta*, **466**, 393 (1977)
- 5) H. Akutsu, Y. Akamatsu, T. Shinbo, K. Uehara, K. Takahashi, Y. Kyogoku: *Biochim. Biophys. Acta*, **598**, 437 (1980)
- 6) A. D. Bangham: Cell Membranes (G. Weissmann and R. Claiborne ed.) p. 24, HP Publishing Co., New York (1975)
- 7) 三井利夫, 浜中俊明: 生物物理, **15**, 1 (1975)
- 8) R. N. McElhancy: *J. Mol. Biol.*, **84**, 145 (1974)
- 9) A. D. Bangham, J. Degier, G. D. Greville: *Chem. Phys. Lipids*, **1**, 225 (1967)
- 10) 吉川渉, 阿久津秀雄, 京極好正, 赤松穰: 第16回日本生物物理学会予稿集, p. 47, 仙台 (1977)
- 11) 吉川渉, 阿久津秀雄, 京極好正: 第17回日本生物物理学会予稿集, p. 328, 名古屋 (1979)
- 12) 斎藤肇: 生化学, **52**, 172 (1980)
- 13) G. W. Stocker, C. F. Polnaszele, A. P. Tulloch, F. Hansen: *Biochemistry*, **15**, 954 (1976)
- 14) J. H. Davis, C. P. N. Chal, G. Weeks, M. Bloom: *Biochemistry*, **81**, 2103 (1979)
- 15) P. R. Cullis, A. C. McLaughlin: *Trends in Biochem. Sci.*, **2**, 196 (1977)
- 16) P. R. Cullis and B. Kruijff: *Biochim. Biophys. Acta*, **436**, 523 (1976)
- 17) E. Burnell, L. V. Alphen, A. Verkleij, B. D. Kruijff: *Biochim. Biophys. Acta*, **597**, 492 (1980)
- 18) J. Seelig: *Biochim. Biophys. Acta*, **515**, 105 (1978)

Membranes and Intercellular Communication ed. by R. Balian, M. Chabre & P. Devaux

1980, xxxii 658pp, 定価 32, 500円, North-Holland, Amsterdam

本書は 1979 年の 7 月 30 日から 8 月 30 日の間に開催された Les Houches 夏の学校の講演とセミナーの集大成である。もともとの夏の学校は世界の最先端を行くフランスの物理学の分野での 1 ヶ月にも及ぶ夏の合宿である。毎年の主題は、時に理論物理学、時に量子論、プラズマ物理学、高エネルギー等物理学の分野を次々と網羅して、この年の第33回に至って生物学と物理学のさしわたし、本書の緒言にもあるように、大学では生物物理学である表題の主題を取り上げたものである。現在の生体膜 (Plasma membrane 形質膜, 細胞膜) は Singer の 2 層のリン脂質間にタンパク質が組み込まれている構成すなわちモザイクモデルとして理解できる。その Singer がまず口火を切って緒言講演を行った。次いで Seeling が第 1 コースとして人工膜と生体膜の物理的性質を詳細に解説した。次に生体膜のリン脂質の多形現象とその間に組に組み込まれたタンパク質の移動性に関し 2 つのセミナーの記述がある。以下順に第 2 コース: 生体膜表面の糖タンパクでセミナーが生体膜への NMR の応用。第 3 コース: 生体膜のタンパク構造でセミナーは流動性膜中に組み込まれたタンパクロドプシンの構造。第 4 コース: 生体膜の免疫認識タンパク。第 5 コース: 生体膜レベルでの免疫機構と第 5 コースの 2 は免疫とリンパ球。第 6 コース: 生体膜のホルモンレセプターと生体膜のレセプターから GTP への情報変換タンパクの伝達機構と

cAMP の関与。セミナーはシナプス伝達における cyclic nucleotides の役割, アンギオテンシン II の生物活性, ギャップ結合と細胞間連絡の 3 つ。第 7 コース: 生体膜のイオン輸送でセミナーが生体膜の表面荷電。第 8 コース: 神経細胞膜の興奮性でセミナーは神経筋細胞膜の陽イオン輸送の能動輸送ポンプ機構。第 9 コース: シナプス伝達部の後シナプス膜のイオン透過性の変動でセミナーは *in vitro* でのコリンレセプターの構造と機能。最終が第10コース: マウス小脳と発生途次の神経筋接合部のシナプス形成を制御する遺伝的また遺伝外の要因として、慶大の御子柴氏の留学された J-P. Changeux が最後を締めくくった。

細胞膜の最新生理学が見事に述べ尽くされて、評者自身特に免疫の部分では大変勉強になった。生体膜の一般生理学とでもいうべき基礎的なことはほとんど全て本書で理解できる。引用文献も最新のものが含まれ、各方面とも渉猟されており、見事な大学院レベルの教課書にまとめあげられている。生体膜の基礎編としてはほぼ完璧といえよう。日本にもいくつか夏の学校は開催されているが、せいぜい 3, 4 日間で一体どれ程の内容が消化できようか。特定の分野だけなのかもしれないが、こんな夏の学校が 30 年以上も続いているフランスは恐ろしいような気がしてきた。

(広島大学歯学部 菅野義信)