スピンプローブ法と示差走査熱量分析法による合成二分子膜 およびリン脂質二分子膜の機能評価

(1982 年 6 月 21 日 受 理)

本 田 終 一・故 楠 本 直**・平 山 忠 一*・国 武 豊 喜***・本 里 義 明

極性基とアルキル鎖長の異なった合成二分子膜およびリン脂質二分子膜について、ゲル-液晶相転移温度での吸熱量、アルキル鎖部分の運動性および基質の取り込みの相違を示差走査熱量分析法とスピンプローブ法を用いて検討した。またコレステロールを二分子膜に混入させた場合の物性変化についても検討した。示差走査熱量分析法により、アンモニウム塩、リン酸塩、コハク酸塩型の極性基をもつ合成二分子膜はホスファチジルコリン型のグリセロリン脂質二分子膜にくらべて相転移熱、転移エントロピーが大きい。またスピンプローブ法によれば、基質の 2,2,6,6-テトラメチル-1-ピペリジニルオキシルの二分子膜への取り込みはリン脂質膜では合成二分子膜のそれにくらべて最大 8.7 倍を示した。さらに脂肪酸型プローブ剤を用いて緩和時間の測定から活性化エネルギーを求めた結果、アルキル鎖長または不飽和結合の有無によって相違が認められた。コレステロールをこれらの二分子膜に混入すると相転移は消滅し、基質の二分子膜への取り込みは阻害され緩和時間は大きくなる。

1 緒 言

細胞の内部組織において細胞膜、核膜などに 50~100 Å の厚みをもつ二分子膜構造が存在することが知られており生体膜と総称されている。二分子膜を構成する脂質分子は、二分子膜平面に沿った側方拡散あるいは二分子膜平面の垂直方向での脂質分子の交換（フリップフロップ現象）¹⁾ など様々な分子運動が可能であり、きわめて流動性に富んでいる。現在ではこれらの分子運動にともなう流動性の変化が生体膜の輸送機能などの発現に重要な意義をもつことが知られている。さらにここ数年、生体膜の二分子膜構造を形成するリン脂質と類似した両親媒性の構造をもつ化合物にも二分子膜形成能があることが知られるようになり、合成二分子膜として触媒性および不斉場を利用した反応などへの応用あるいは様々な機能性を付与することがさかんに研究されている。しかし、これらの合成二分子膜の物性に関する研究は少ないが最近いくつかの報告がみられる^{2)~4)}。

そこで本研究では合成化合物としてジアルキルアンモニウム塩、リン酸ジアルキルエステル塩、スルホコハク酸ジアルキルエ

ステル塩および天然リン脂質として卵黄レシチン、ジパルミトイルホスファチジルコリンを用いて超音波処理して、マルチラメラ構造をもつ二分子膜を構成し²⁾、その熱的物性、分子運動性に関する基礎的研究を示差走査熱量分析法（以下 DSC 法と略記する）、スピンプローブ法を用いて行なった。また生体膜系の二分子膜の流動性や透過性を調整するといわれるコレステロールを合成二分子膜に混入して、その影響について検討を行なった。

2 実 験 方 法

2.1 二分子膜試料

二分子膜試料としては、ジアルキルジメチルアンモニウム=ブロミド、リン酸ジアルキルナトリウム、スルホコハク酸ジアルキルエステル=ナトリウム塩（以下それぞれ $2C_nN^+2C_lBr^-$, $2C_nPO_4^-Na^+$, $2C_nSO_3^-Na^+$ と略記する⁵⁾）、卵黄レシチン（Panaborn の改良法⁶⁾に準じて鶏卵から溶媒抽出精製し、赤外吸収スペクトル⁷⁾により確認した）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（以下 DPPC と略記する。試薬特級、シグマ社、米国）を使用した。図 1 に分子式を示す。

2.2 スピンプローブ剤

2,2,6,6-テトラメチル-1-ピペリジニルオキシル (2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy), 2-(10-カルボキシデシル)-2-ヘキシル-4,4-ジメチル-3-オキサゾリジニルオキシル (2-(10-carboxydecyl)-2-hexyl-4,4-dimethyl-3-oxazolidinyloxy) (以下それぞれ TEMPO, I(10,5) と略記する。試薬特級, Syva 社,

5) T. Kunitake, Y. Okahata, K. Tamaki, F. Kumamaru, M. Takayanagi, *Chem. Lett.*, 1977, 387.

6) 日本化学会編, “実験化学講座 23 (生物化学)”, 丸善 (1957) p.491.

7) 永井克孝, 野島庄七, “脂質”, 朝倉書店 (1973) p.247.

熊本大学工学部合成化学科, 860 熊本市黒髪

** 熊本大学工学部工業化学科, 860 熊本市黒髪

*** 九州大学工学部合成化学科, 812 福岡市箱崎

1) R. D. Kornberg, H. M. McConnell, *Biochemistry*, 10, 1111(1971).

2) T. Kajiyama, Y. Hamada, F. Kumamaru, M. Takayanagi, Y. Okahata, T. Kunitake, *Rept. Prog. Polym. Phys. Jpn.*, 21, 701(1978).

3) M. Kodama, M. Kuwabara, S. Seki, *Thermochim. Acta*, 50, 81(1981).

4) Y. Okahata, R. Ando, T. Kunitake, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 85, 789(1981).

Scheme 1 Molecular structures and abbreviations of the compounds used in this experiment

Scheme 2 Molecular structures of the spin probe

米国)はそのまま使用した。図式2に分子式を示す。

2.3 DSC 測定

絶乾した二分子膜試料を含水率の変化を抑えるため、内径 4 mm の短いガラスサンプル管に約 20 mg 精秤してその 10 倍量の水とともに加えて密栓して含水率 91 wt% の混合物とし、これを 60~70°C の湯浴に浸して 30 分間超音波処理して均一な分散液を得た。放冷してからすばやく DSC 測定用ふた付きセルに密封して熱量測定を行なった。装置は島津 SC-20 型を用い昇温速度 2.5°C/min で測定した。吸熱量は単位モルあたりに換算したエンタルピー変化 ΔH と相転移温度 T_c とから相転移での自由エネルギーを 0 としエントロピー変化 ΔS として表わした。

$$\Delta S = \Delta H / T_c \quad (1)$$

また、膜の相転移をアルキル鎖の屈曲運動の増加、つまり炭素-炭素結合のトランス形からゴーシュ形へのコンホメーションの変化とみなしてゴーシュ結合数を次式⁹⁾で見積もった。

$$\Delta S = k \ln m, \quad m = n - 2C_l \cdot 2^l \quad (2)$$

ここで、 k は Boltzmann 定数、 n はアルキル鎖 1 本あたりの炭素-炭素結合、 l はゴーシュ結合数、 m は状態数を表わす。

2.4 ESR 測定

プローブ剤のアセトニトリル溶液をマイクロシリンジで内径 4 mm のガラスサンプル管に入れ軽く吸引して溶媒を除いた。つぎに既知濃度 (mg/ μ l) の二分子膜試料のクロロホルム溶液から所定量の二分子膜試料を加えて軽く吸引して溶媒を除いたのち、減圧 (1~5 mmHg) して溶媒を除去し、これに 0.1 mol/l HCl-0.2 mol·dm⁻³ トリス緩衝液 (pH 7.05~7.20) を所定量の二分子膜濃度 (3~10 mmol·dm⁻³) になるように加えて密閉した。この混合物を試料の T_c より約 10°C 高い湯浴に浸して 1 時間超音波処理することによって透明な二分子膜の分散液を得た。このようにし

Fig. 1 Plots of the phase transition temperature (T_c) versus number of the carbon atoms (n) in alkyl chain

○ : $2C_nPO_4^-Na^+$, △ : Diacylglycerophosphocholine, □ : $2C_nN^+2C_1Br^-$

て得られた二分子膜はマルチラメラ構造であることが電子顕微鏡写真によって確かめられている²⁾。これを内径 0.5 mm の毛細管に密封して ESR 測定用試料とした。コレステロールの添加はクロロホルム溶液として二分子膜試料添加と同時に進めた。プローブ剤濃度は 0.1 mmol·dm⁻³ 程度とし二分子膜への影響を少なくするように考慮した。測定は試料毛細管を測定用石英管に入れ、熱電対により $\pm 0.5^\circ\text{C}$ の精度で日本電子(株)製電子スピン共鳴装置 (JESFEAX, X-バンド, 磁場変調) を用いて行なった。

3 実験結果および考察

3.1 ゲル-液晶相転移に関する DSC 測定結果

二分子膜の熱的挙動のうち、二分子膜のゲル-液晶相転移については X 線回折やスピンプローブ法からすでによく知られていることである⁹⁾¹⁰⁾。本実験の合成二分子膜についても DSC 測定からゲル-液晶相転移が観察された。

図 1 は二分子膜の T_c をアルキル鎖炭素数に対してプロットしたものである。極性基の同じ系列では、アルキル鎖長が増すに

9) D. M. Engelman, *J. Mol. Biol.*, **47**, 115(1967).

10) O. H. Griffith, *ibid.*, **59**, 77(1971).

8) 木村初男, 化学の領域, **34**, 912(1980).

Table 1 Thermodynamic data for the membrane-water system at gel-liquid crystal phase transition

Material	T_g (°C)	Endothermal capacity (cal/g)	Enthalpy ΔH (kcal/mol)	Entropy ΔS (cal/mol·deg)	Number of gauche bonds per one chain
$2C_{12}N^{\oplus}2C_1Br^{\ominus}$	18	26.3	12.2	41.9	3.0
$2C_{16}N^{\oplus}2C_1Br^{\ominus}$	51	20.2	12.7	39.3	2.5
$2C_{12}PO_4^{\ominus}Na^{\oplus}$	47	18.7	8.5	26.7	>3.8
$2C_{16}PO_4^{\ominus}Na^{\oplus}$	72	17.4	10.0	29.1	3.8
$2C_{12}SO_3^{\ominus}Na^{\oplus}$	28	18.0	10.0	33.2	—
DPPC	41	7.8	6.0	19.0	1.5

Fig. 2 Dependence of the mole fraction of cholesterol for $2C_{18}N^{\oplus}2C_1Br^{\ominus}$ on the endothermal capacity at the phase transition temperature

たがって T_g が高温側へシフトすることがわかる。また同じアルキル鎖長をもつ二分子膜の T_g は極性基の構造によって影響される。

表1はゲル-液晶相転移における二分子膜の T_g および吸熱量を示したものである。報告⁴⁾¹¹⁾の T_g 値と比較的よく一致している。合成二分子膜の ΔH および(1)式によって求められた ΔS が生体膜成分の DPPC 二分子膜のそれと比較して大きい値をとることは注目される。これら二分子膜素材による吸熱量の相違は二分子膜を構成するアルキル鎖長、極性基の違いによる各種分子間相互作用の差が寄与したものと考えられる。

(2)式から求めたゴースユ結合数については、合成二分子膜はリン脂質二分子膜の DPPC にくらべて約2倍の値を示した。脂肪族炭化水素のゴースユ結合1個の生成には約 0.4kcal 程度の熱量が必要とされるから、相転移においてはこれらの合成二分子膜には 2~3kcal/mol 程度のアルキル鎖による内部エネルギーの増加があると考えられる。合成二分子膜の相転移に関して脂質以外の物質の混入による影響を調べるために動物細胞に多く存在するコレステロールを用いて、熱的物性におよぼす効果を検討した。

図2は $2C_{18}N^{\oplus}2C_1Br^{\ominus}$ とコレステロールのモル比を変化させた場合の転移熱の変化を示したものであるが、コレステロールの増加とともに転移熱が減少し 60mol% のコレステロール混入に

Fig. 3 ESR spectrum of TEMPO diffusing in the $2C_{18}N^{\oplus}2C_1Br^{\ominus}$ membrane

Concn.: 5wt% $2C_{18}N^{\oplus}2C_1Br^{\ominus}$ aqueous dispersion
Cholesterol content: 20mol% for $2C_{18}N^{\oplus}2C_1Br^{\ominus}$
Temp.: 60°C

よって転移熱は0に近い値をとり相転移がほぼ見られなくなることがわかる。このことは、DPPC 二分子膜についてコレステロールが増加するとともに転移熱が減少し、等量になると転移が見られなくなるといふ Chapman らの結果¹²⁾と一致するものであり、コレステロールがゲル相における脂質間の配向をくずしていることを示唆している。

3.2 スピンプローブ法による測定結果

3.2.1 二分子膜の TEMPO の分配定数：極性・無極性の2相が共存する検体については、プローブが両相に分配されるときにスペクトルのピークが二重に分裂することを利用してプローブの両相中の分配率を求めることができる。

図3に $2C_{18}N^{\oplus}2C_1Br^{\ominus}$ 二分子膜の水分散液中の TEMPO プローブの ESR スペクトルを示す。高磁場線が二重に分裂しているが、その内側のピーク（ピーク高 H ）は二分子膜相に取り込まれた TEMPO のシグナル、外側のピーク（ピーク高 P ）は水相に溶けた TEMPO のシグナルである。このうち水相のシグナルはニトロキシドラジカルの還元剤で水溶性の L-アスコルビン酸で系を処理すると消去できる。スペクトルの高さの比をつぎのようにとすることで TEMPO の膜相への溶解度の分率をパラメータ化して f 値として表わすことができ、

$$f = \frac{H}{H+P} \quad (3)$$

さらに TEMPO の膜相および水相の分配定数を K 、膜相および水相の体積を V_m , V_w とすると

11) T. Kunitake, Y. Okahata, R. Ando, S. Shinkai, S. Hirakawa, *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 7877(1980).

12) B. D. Ladbrooke, R. M. Williams, D. Chapman, *Biochim. Biophys. Acta*, 150, 333(1968).

Fig. 4 Temperature dependence of the distribution coefficient (K_{obs})

	Cholesterol content	
	0 mol%	20 mol%
$2C_{18}N^+2C_1Br^-$	□	■
DPPC	○	●
$2C_{12}PO_4^-Na^+$	△	▲

Table 2 Calculated distribution coefficient (K_{obs}) of TEMPO in the membrane-water system

Material	Temperature of measurement (°C)	K_{obs}
$2C_{12}N^+2C_1Br^-$	25	6.6
$2C_{18}N^+2C_1Br^-$	51	5.9
$2C_{12}PO_4^-Na^+$	55	3.6
Egg yolk lecithin	45	16.0
DPPC	45	15.0

$$f = \frac{KV_m/V_w}{1 + KV_m/V_w} \quad (4)$$

である¹³⁾。そこでこの逆数をとると

$$\frac{1}{f} = 1 + \frac{1}{K} \cdot \frac{V_w}{V_m} = 1 + \frac{1}{K_{obs}} \cdot \frac{W_w}{W_L} \cdot \frac{\sigma_L}{\sigma_w} \quad (5)$$

ここで、 W_w , W_L および σ_w , σ_L はおのおの水相、膜相の重量と密度である。膜相の密度はタンパク質の存在の少ない生体膜の密度がほぼ 1 に近いこと¹⁴⁾から、(5)式は(6)式のように近似される。

$$\frac{1}{f} = 1 + \frac{1}{K_{obs}} \cdot \frac{W_w}{W_L} \quad (6)$$

(6)式から TEMPO の膜相と水相との分配定数 K_{obs} を求めた。 $2C_{18}N^+2C_1Br^-$, $2C_{12}PO_4^-Na^+$ および DPPC 二分子膜における TEMPO の分配定数の温度依存性は T_c 以下ではほとんど 0 に等しく、 T_c 付近で急激に大きくなり T_c 以上ではほぼ一定の値であった (図 4 参照)。 T_c 以上の温度で測定した各種二分子膜系の TEMPO の K_{obs} は極性基による影響を受けるが、ア

Fig. 5-a Temperature dependence of ESR spectra of 2-(10-carboxydecyl)-2-hexyl-4,4-dimethyl-3-oxazolidinyloxy diffusing in the $2C_{18}N^+2C_1Br^-$ membrane

$2C_{18}N^+2C_1Br^-$: 6.0×10^{-3} mol/l

Fig. 5-b Temperature dependence of ESR spectra of 2-(10-carboxydecyl)-2-hexyl-4,4-dimethyl-3-oxazolidinyloxy diffusing in the DPPC membrane

DPPC: 5×10^{-3} mol/l

13) 日本生化学会編, “生化学実験講座 14 (生体膜)”, 東京化学同人 (1977) p. 51.

14) 近畿化学工業会編, “膜 (化学増刊 64)”, 化学同人 (1978) p. 23.

ルキル鎖長の影響は小さい (表 2 参照)。また二分子膜にコレステロールを 20 mol% 混入したときの TEMPO の K_{obs} の変化を図 4 中に示した。2 種の合成二分子膜は DPPC 二分子膜と同様、 T_c 付近での K_{obs} の立ち上がりは減少し、コレステロール

Fig. 6 Arrhenius plots of correlation time for the spin probed membrane with 2-(10-carboxydecyl)-2-hexyl-4,4-dimethyl-3-oxazolidinyloxy

□ : $2C_{12}N^+2C_1Br^-$, ● : $2C_{18}N^+2C_1Br^-$,
○ : Egg yolk lecithin, △ : DPPC

による TEMPO の膜内への取り込みの阻害効果が顕著であり、合成二分子膜はリン脂質二分子膜にくらべて TEMPO の取り込み能力が小さいことがわかる。

3.2.2 脂肪酸型プローブによる二分子膜の分子運動性：二分子膜のアルキル鎖部分の流動性に関する情報を得るために二分子膜と類似の分子構造をもつ脂肪酸型プローブを用いた。図 5-a, b はそれぞれ $2C_{18}N^+2C_1Br^-$, DPPC 二分子膜をプローブ I(10, 5) でプローブしたときの ESR スペクトルである。

両二分子膜とも T_c 付近からスペクトルは強度の強い等方的な鋭い 3 本線スペクトルに移行するのが観察される。水相のプローブに起因した副次的な小さなスペクトルはいずれの場合も観察されなかった。一方、コレステロールを混入した場合、合成二分子膜系においては温度に関係なく ESR スペクトルは水相に存在するプローブに起因した鋭い等方的なものが得られ、コレステロールは、プローブ I(10, 5) に対するいちじるしい排除効果を生じた。Kivelson の式(7)式に準じてこのプローブのアルキル鎖部

の運動の緩和時間 τ_c (回転相関時間) を求めた¹⁵⁾。

$$\tau_c = \left\{ \left(\frac{h_0}{h_{+1}} \right)^{1/2} + \left(\frac{h_0}{h_{-1}} \right)^{1/2} - 2 \right\} \frac{4\pi\sqrt{3}}{b^2} \cdot W_0 \quad (7)$$

ここで、 W_0 は中央ピークの線幅、 h_{+1} , h_0 , h_{-1} は低磁場側から 3 本線のそれぞれのピークの高さ、 b はプローブの種類によって決まる定数を表わす。種々の二分子膜について τ_c に関する Arrhenius プロットを図 6 に示した。活性化エネルギーはいずれの二分子膜についても 6~8 kcal/mol 程度である。とくにアルキル鎖長が短い $2C_{12}N^+2C_1Br^-$ 二分子膜およびアルキル鎖長中に二重結合が含まれる卵黄レシチン二分子膜では活性化エネルギーは小さい。プローブの動きはそれが存在する環境に対応しているから、これらの膜の疎水性部分は流動性に富んでいることが示唆される。

4 結 論

本研究では数種の合成二分子膜を卵黄レシチンおよび DPPC 二分子膜と対比しながら DSC 法、スピンプローブ法を用いて二分子膜の熱的物性および運動性を検討した。

(1) DSC 測定から、ジアルキルアンモニウム塩、リン酸ジアルキルエステル塩、スルホコハク酸ジアルキルエステル塩型合成二分子膜はホスファチジルコリン型のグリセロリン脂質二分子膜にくらべて、相転移での吸熱量、転移エントロピーの値が大きい。

(2) 基質として用いたプローブ剤 TEMPO の二分子膜への取り込みは合成二分子膜で非常に小さく、リン脂質二分子膜は合成二分子膜のそれにくらべて最大 8.7 倍にもおよんだ。さらに基質として脂肪酸型プローブ剤 I(10, 5) を用いて分子運動の緩和時間を測定し活性化エネルギーを求めた結果、アルキル鎖の鎖長が短いもの、卵黄レシチンのようにアルキル鎖長が長いにもかかわらずその中に不飽和結合を含んでいる系では活性化エネルギーは小さく、膜の疎水部は柔軟性に富んでいることが示唆された。

(3) 二分子膜にコレステロールを混入した系では、コレステロールの濃度が増すと相転移熱は減少し、プローブの緩和時間が大きくなる。また同時に基質の二分子膜中への取り込みに関する阻害効果が顕著に現われるが、この効果は合成二分子膜ではとくにいちじるしい。

終りに本研究に関し、種々御討議いただいた西田治男、宇都久美子両氏に深く感謝致します。

15) D. Kivelson, *J. Chem. Phys.*, 33, 1904(1960).

Evaluation of the Function of Synthetic Bimolecular Membranes and Phospholipids by Spin-Probe Method and Differential Scanning Calorimetry

Shuichi HONDA, The late Naoshi KUSUMOTO**, Chuichi HIRAYAMA*,
Toyoki KUNITAKE*** and Yoshiaki MOTOZATO

*Department of Synthetic Chemistry, Faculty of Engineering,
Kumamoto University; Kurokami, Kumamoto-shi 860 Japan*

** *Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering,
Kumamoto University; Kurokami, Kumamoto-shi 860 Japan*

*** *Department of Organic Synthesis, Faculty of Engineering,
Kyushu University; Hakozaki, Fukuoka-shi 812 Japan*

The amount of heat absorption of synthetic bimolecular membranes and phospholipids, which contained various polar groups and alkyl chain of different length at gel-(liquid crystal) phase transition temperature, the movements of alkyl chain part of the membranes and the differences of incorporation of probe into the membranes were studied by differential scanning calorimetry and the spin-probe method. The variation of physical properties of the bimolecular membranes at incorporation with cholesterol into the membranes was also investigated. According to the measurements of differential scanning calorimetry, the synthetic bimolecular membranes containing ammonium salt, phosphate and sulfonate as the polar groups had larger amounts of heat absorption and transition entropy than phosphoglycerides bimolecular membrane of phosphatidylcholine type. The incorporation of 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxyl used as a spin-probe into the phospholipids membranes was 8.7 times higher than those of the synthetic bimolecular membranes. The activation energy, obtained from the measurement of relaxation time by molecular movements using spin-probe of aliphatic acid type, was remarkably influenced by the length of alkyl chains and existence of the unsaturated bond. By the incorporation of cholesterol into the bimolecular membranes, phase transition was eliminated and the incorporation of the probe into the bimolecular membranes was disturbed. These phenomena were interpreted on the basis of a variation of fluidity of the bimolecular membranes.

~~~~~