薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
101 (12) 1099-1107 (1981)

ミセル表面におけるレシチンと Phospholipase D の界面反応

中垣正幸, 山本いづみ*,¹⁾ (旧姓 加藤)

京都大学薬学部

The Interfacial Reaction of Lecithin and Phospholipase D at the Micellar Surface

MASAYUKI NAKAGAKI and IZUMI YAMAMOTO*,¹⁾ (née KATO)

Faculty of Pharmaceutical Science, Kyoto University, Yoshida,
Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

(Received June 1, 1981)

Hydrolysis of lecithin by phospholipase D at the mixed micelle surfaces composed of L- α -dipalmitoyl (DPPC) or dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) and hepta-ethyleneglycol dodecylether (C₁₂-E₇) was investigated. The interfacial reaction was analyzed by measuring the fluorescence change of 8-anilino-1-naphthalenesulfate (ANS) present in the micelle solution. As the result, it was observed that, with increasing initial mol fraction of lecithin, X_{PC}^0 , the rate constant of the enzymatic process decreased, and that an initial slow reaction occurred in the mixed micelle solution with large initial mol fraction of lecithin. The rate constant decreased at higher temperature than cloud points of the mixed micelles. On the basis of these results, the interaction between phospholipase D and mixed micelles at the interface and difference of the reactivity due to the variation of the state of lecithin were discussed.

Keywords—phospholipase D; interfacial reaction; 8-anilino-1-naphthalenesulfate (ANS); lecithin; hepta-ethyleneglycol dodecylether; mixed micelle

生体内の酵素反応は、細胞内外の溶液相中で起こる場合もあるが、酵素または基質のいずれか一方または両者が生体膜中に存在して、酵素反応が膜表面で行なわれる場合もある。このような酵素の界面反応は、界面の環境に大きく左右される。我々は、リボゾーム系を用いてリボゾーム表面領域での電位を測定し、それが成分により著しく異なることを報告した²⁾が、このような表面電位などのために界面の環境は溶液相とはかなり異なるので、溶液相反応に関する知見にもとづいて直ちに界面反応を議論することは出来ない。

Phospholipase D (E. C. 3. 1. 4. 4.) は種々の植物に存在し、レシチンをホスファチジン酸とコリンに分解する酵素である。Allgyer & Wells³⁾によると、phospholipase D と短鎖レシチンとの反応においては、レシチンがある濃度以上になるとその反応性が急激に増加するという。また、エチルエーテルやアニオン性界面活性剤を添加すると、反応が促進されることも報告されている。⁴⁾ 単分子膜法においては、この反応の進行が表面圧依存性であり、表面圧が高くなるにつれ分解速度は上昇するが、約 28 dynes·cm⁻¹ 以上になると反応が停止するという。⁵⁾ このように、phospholipase D とレシチンの反応においては、界面の有無のみならず、基質となるレシチンの状態によって反応速度が左右されることが考えられる。

Phospholipase D とレシチンミセルの界面反応は、界面の環境と脂質の物理的存在状態に主に影響をうけるものであり、この反応を研究することは、生体膜表面での酵素反応の様子に何らかの情報を与えるものと思われる。我々は、合成レシチンと非イオン性界面活性剤の混合ミセル溶液を作り、これと phospholipase D とを反応させ、混合ミセルの組成と反応速度定数、および活性化自由エネルギーの関係について研究した。

実 験 の 部

試料および試薬 L- α -Dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC), L- α -dimyristoyl phosphatidylcholine

(DMPC), および L- α -dipalmitoyl phosphatidic acid (DPPA) は合成品を SIGMA 社より購入し, 粉体のまま -20°C に保存した. これらのレシチンは, 24時間真空乾燥した後計量した. また, 非イオン性界面活性剤として, hepta-ethyleneglycol dodecylether ($\text{C}_{12}\text{-E}_7$) を日光ケミカルズ社より購入し, 冷蔵庫で 5°C に保存しそのまま用いた. Phospholipase D は, Boehringer Mannheim Gmb 社より購入し, 冷蔵庫で 5°C に保存し, 用時緩衝液に溶解して用いた.

今回の反応に用いた溶液は, すべて, 5 mM Hepes (半井化学社製), 0.2 mM Tris (和光純薬工業社製), 60 mM CaCl_2 (半井化学社製) を含む pH5.6 の緩衝液を用いた. 蒸留水は二度蒸留したもの, クロロホルム (半井化学社製) は特級を蒸留して用いた.

酵素反応 レシチンと $\text{C}_{12}\text{-E}_7$ を種々の割合でクロロホルムに溶解する. 湯浴上 (約 70°C) クロロホルムを留去し, 真空ポンプで 24 時間, 室温で真空乾燥する. クロロホルムを完全に除くことは, 系の安定性および再現性に重要なことである. これを, 8-anilino-1-naphthalene sulfate (ANS) (和光純薬工業社製) の, 2.0×10^{-5} M 溶液に溶解し, 均一な混合ミセル溶液とする. 混合ミセル溶液 3 ml に, $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ の phospholipase D 溶液 0.5 ml を加え酵素反応を開始する. 同時に, 反応溶液の蛍光強度の時間的変化を測定した.

蛍光強度の測定 蛍光は, 日本分光の FP-550 型分光蛍光光度計に FP-1050 恒温付属装置を取り付けて測定し, HITACHI の 056 型卓上記録計で記録した. なお, 励起光は 360 nm, 蛍光は 480 nm の波長を用いた.

DPPA による蛍光強度低下 酵素反応の進行と蛍光強度減少の対応性を調べるために, 反応生成物である DPPA を種々の割合に加えたミセルの蛍光強度の測定を行なった. DPPA+DPPC の全モル濃度を一定 (8.0×10^{-4} M, 混合ミセル中レシチンモル分率 0.416) とし, DPPA と DPPC の比を変えた (DPPA+DPPC)/ $\text{C}_{12}\text{-E}_7$ 混合ミセル溶液を, 先に述べた方法と同様にして調製し, その蛍光強度を測定した.

DMPC/ $\text{C}_{12}\text{-E}_7$ 混合ミセルの曇点 先と同じ方法で種々のレシチンモル分率を持つ混合ミセル溶液を作り, 0°C に冷却しておく. この温度で, レシチンモル分率が 0.7 以下のものはすべて透明な液となったが, 0.85 の溶液はすでに白濁しており, この組成ではミセルとして可溶化されないものと結論し, 以下の操作はレシチンモル分率が 0.7 以下の溶液で行なった. 混合ミセル溶液を試験管に入れ, これを湯浴上につけて徐々に温度をあげ, 白濁し始める温度を記録した. また, 温度を下降させ, 白濁した溶液が完全に透明となる温度も測定した.

結 果

DPPC/ $\text{C}_{12}\text{-E}_7$ 混合ミセルと Phospholipase D の反応におけるレシチンモル分率の影響

Phospholipase D は, Ca^{2+} 存在下でレシチンをホスファチジン酸とコリンに分解する酵素である. また, ANS は, 一般に疎水性部位と結合して蛍光を発し, その結合部位の環境を示す蛍光プローブとして知られている. レシチンにも結合して蛍光を発するが, ホスファチジン酸には, 負の電荷による電氣的反発などのために結合しにくいことが報告されている.⁶⁾ このために, レシチンに phospholipase D が作用する際に ANS が共存すれば, その蛍光強度 F は酵素反応の進行と共に減少すると考えられる. Fig. 1 に, 反応溶液の蛍光強度 F の時間 t による変化を示す. この実験ではレシチンとして DPPC を用い, DPPC の量を一定にし, $\text{C}_{12}\text{-E}_7$ の量を変えてミセル組成を変化させた. この場合, $\text{C}_{12}\text{-E}_7$ は phospholipase D の基質となり得ないので, 酵素に対する基質の初濃度は一定となる. 反応開始時におけるミセルの組成を, レシチンモル分率 X_{pc}^0 で表わす. どのミセル組成においても時間 t とともに蛍光強度 F の減少がみられた. また, レシチンの初モル分率 X_{pc}^0 が大きい混合ミセル溶液では, 初期にゆっくりとした減少が観察された. Fig. 1 にみられた反応溶液の蛍光強度 F の減少は, レシチンに結合していた ANS が, 酵素反応に伴うホスファチジン酸生成とともに溶液相へ放出されたためと考える. このように, 蛍光強度 F の減少が, レシチンからホスファチジン酸への変換によって起こることを確かめるため, DPPA の添加による溶液の蛍光強度 F の変化を調べ Fig. 2 に示した. レシチンがホスファチジン酸に置き換わるにつれて, 蛍光強度に減少がみられた. このことから, 蛍光強度の減少速度と酵素反応の速度を対応させて考察することが可能であることがわかる. ところが, DPPA 量が増大すると, 液が白濁し蛍光強度が上昇する. これは, この実験条件ではホスファチジン酸をミセルに可溶化できないためと判断した. 実際, レシチンモル分率の大きい混合ミセルで酵素反応を行なった後, 数時間放置すると, 反応溶液は白濁し蛍光強度が上昇している. しかし, 少なくとも我々の行なった反応条件下では, 生成したホスファチジン酸はミセル内に存在すると思われる. したがって, 時間 $t=0$, および ∞ における蛍光強度を F_0 および F_{∞} とすれば, 混合ミセル中のレシチンの残存率 α は次式で表わされる.

Fig. 1. ANS Fluorescence Change during the Hydrolysis of Mixed Micelles containing DPPC and C_{12} -E $_7$ by Phospholipase D as a Function of Time

X^0_{pc} was varied by changing C_{12} -E $_7$ as DPPC concentration kept constant at 0.8 mM.

The medium contains; 5 mM Hepes, 0.2 mM Tris, 60 mM $CaCl_2$ and 2×10^{-2} mM ANS, at pH 5.6, 29.5°C. The reaction was started by addition of phospholipase D. The enzyme concentration was 0.14 mg/ml. X^0_{pc} ; 0.100 (●), 0.200 (◐), 0.300 (○), 0.416 (▽), 0.500 (▼), 0.600 (▼).

$$\alpha = (F - F_\infty) / (F_0 - F_\infty) \quad (1)$$

このようにして求められた残存率 α と時間 t との関係は、

$$\ln \alpha = -kt \quad (2)$$

となることが期待される。Fig. 1 に示した蛍光強度の経時変化のデータを用いて、 $\ln \alpha$ を時間 t に対し plot したグラフを Fig. 3 に示す。レシチンの初モル分率 X^0_{pc} が小さい混合ミセル溶液ほど傾きが急となり、反応速度定数 k が大きいことがわかる。また、 X^0_{pc} が 0.416 以上では、この直線に屈折点がみられ、反応が2段階になっている。この点については後で述べる。 F_∞ は、このグラフが直線性を示すように決定したが、その値は、それぞれの組成を持つ混合ミセル中の DPPC をすべて、DPPA に置き換えた場合の蛍光強度とほとんど一致した。したがって、 F_∞ は酵素反応が完了した時点での蛍光強度といえる。上に述べたように、蛍光強度減少と酵素反応は対応するから、蛍光強度の減少速度定数 k は酵素反応速度定数に等しいと考えられる。

Phospholipase D は Ca^{2+} を必要とする。ところが、反応生成物であるホスファチジン酸は Ca^{2+} と難溶性の塩を形成する。我々が行なった実験では、 Ca^{2+} 濃度が 60 mM とかなりの高濃度であるので、反応が進行しホスファチジン酸の量が多くなると、 Ca^{2+} 塩として析出し、反応液は濁ってくる。したがって、反応がかなり進んだ時点においては、散乱光のために測定値に誤差が生じることが予想される。Fig. 3 において、時間 t が大きい

Fig. 2. Fluorescence Decrease as DPPC in Mixed Micelles is replaced by DPPA

$$X^0_{pc} = 0.416.$$

Fig. 3. The Relationship between the Logarithm of the Residual Fraction of DPPC, α , and Time for the Reaction shown in Fig. 1

X^0_{pc} ; 0.100 (●), 0.200 (◐), 0.300 (○), 0.416 (▽), 0.500 (▼), 0.600 (▼).

Fig. 4. Variation of the Logarithm of the Rate Constant with the Initial Mol Fraction of DPPC in Mixed Micelles containing DPPC and C_{12} -E $_7$

Fig. 5. The Relationship between the Logarithm of the Residual Fraction of DPPC, α , and Time

X^0_{pc} is varied by exchanging DPPC concentration keeping the C_{12} -E $_7$ concentration at 1.12 mM.

Experimental condition is the same as Fig. 1. X^0_{pc} ; 0.101 (●), 0.201 (⊕), 0.254 (⊖), 0.301 (⊙), 0.351 (⊖), 0.416 (⊙), 0.500 (⊙), 0.551 (⊙), 0.599 (○).

い時に、測定点が直線より上へずれているのはこのためと思われる。

Fig. 3 の直線の傾きから得られた反応速度定数 k の対数値とレシチンの初モル分率 X^0_{pc} の関係を Fig. 4 に示す。 X^0_{pc} が 0.416 より大きくて反応が二段階となっているものは、屈折点以後の傾きについて考察した。

レシチンの初モル分率 X^0_{pc} が 0.36 以下では反応速度定数は一定となるが、それ以上になると、レシチンモル分率の増加とともに減少していく。

以上の実験を、 C_{12} -E $_7$ を一定とし DPPC 量を変化させて X^0_{pc} を変えた場合についても行なった。ここでも先と同様に、 $\ln \alpha$ と時間 t との関係を調べ Fig. 5 に示した。やはり、 X^0_{pc} の増加に伴ない直線の傾きは小となり、かつ X^0_{pc} が 0.416 以上では屈折点が生じ反応が二段階となった。

TABLE I. The Mol Fraction of DPPC, X_{pc} , at the Breaking Point, at 29.5°C

I) C_{12} -E $_7$ constant (Fig. 5)			II) DPPC constant (Fig. 3)		
X^0_{pc}	α'	X'_{pc}	X^0_{pc}	α'	X'_{pc}
0.60	0.691	0.414	0.60	0.644	0.398
0.55	0.763	0.421	—	—	—
0.50	0.803	0.401	0.50	0.795	0.397
0.42	0.951	0.396	0.42	0.961	0.400

X^0_{pc} ; the initial mol fraction.

α' ; the residual fraction of DPPC.

X'_{pc} ; the mol fraction at the breaking point.

Fig. 3 および Fig. 5 において、レシチンの初モル分率 X^0_{pc} が 0.416 以上の直線にみられた屈折点についての考察を、Table I に示す。 α' は屈折点での DPPC 残存率であり、 X'_{pc} は屈折点での DPPC モル分率である。残存率 α' は、レシチンの初モル分率 X^0_{pc} が小さい程大きくなっているが、屈折点での DPPC モル分率は開始時の値によらずほぼ 0.4 となった。また、DPPC 一定 (Fig. 3) の場合も、 C_{12} -E $_7$ 一定 (Fig. 5) の場合も同じくは

ば 0.4 となった。これは、このモル分率付近でミセル中の DPPC の溶解状態が変化し、モル分率 0.4 以上では酵素の作用を受けにくく、反応速度が小さくなると考えられる。

DMPC/C₁₂-E₇ 混合ミセルにおける反応の温度依存性

今までの実験では、同温度においてはレンチンモル分率により反応速度定数 k が異なるという結果が得られた。レンチン単分子膜の phospholipase A₂ による分解は、相転移点で最大となる。⁷⁾ ここに示す結果も同様に、レンチンの物理的存在状態の違い、たとえば相転移が関係していると考えた。そこで、相転移温度の低い DMPC を用いて実験を行なった。DPPC の転移温度 41°C に比べ、DMPC のそれは 23°C であるので、その前後の温度における実験が行ないやすいためである。ここでは、基質である DMPC の量を一定とし、C₁₂-E₇ によりモル分率を変化させて実験を行なった。

このようにして、混合ミセルと phospholipase D の反応を種々の温度で行ない、その $\ln \alpha$ と時間 t との関係を調べた。

Fig. 6. Effect of Temperature on the Linear Relationship between the Logarithm of the Residual Fraction of DMPC and Time

$X_{pe}^0 = 0.500$

Temperature; 16.0°C (▽), 18.5°C (●), 20.0°C (○), 21.5°C (⊙), 23.1°C (⊖), 25.0°C (⊕), 25.9°C (▼), 26.8°C (▽).

Fig. 7. Arrhenius Plot on the Activity of Phospholipase D at Various Compositions of Micelles, X_{pe}^0 , which were formed of DMPC and C₁₂-E₇

X_{pe}^0 ; 0.40 (●), 0.50 (⊙), 0.55 (⊕), 0.60 (⊖), 0.70 (○).

Fig. 6 には、レンチン初モル分率 X_{pe}^0 が 0.5 の場合を例として示した。DPPC 混合ミセルでみられた屈折点はここではみられず、 $\ln \alpha$ と t との関係は、実験した全温度範囲でいずれも直線性が得られた。温度上昇に伴ない、この直線の傾きは急になるが、26°C 以上になると再び緩やかになる。これと同様の実験を種々のモル分率を持つ混合ミセル溶液で行ない、その温度と反応速度定数の関係を調べた。モル分率 X_{pe}^0 が大きくなると、DPPC/C₁₂-E₇ 混合ミセルと同様屈折点がみられたので、その場合には屈折点以後の傾きについて考察した。

Fig. 7 には、温度と反応速度定数の関係を Arrhenius 型 plot にして示した。このグラフから、混合ミセルと phospholipase D の反応は、屈折点によって 2 つの部分に分けられることがわかる。1 つは屈折点より右側、すなわち低い温度の範囲での反応であり、この範囲で Arrhenius 型 plot は負の傾きを持つ直線となる。この傾きは、混合ミセルの組成により異なり、レンチン初モル分率 X_{pe}^0 が小さい程傾きが小となっており、かつ X_{pe}^0 が 0.5 以下では一つの同一の直線にのった。この直線から、18°C における $\ln k$ の値を読み取り、その値と X_{pe}^0 の関係を Fig. 8 に示した。少なくとも X_{pe}^0 のこの範囲では、 $X_{pe}^0 < 0.52$ で $\ln k$ の値は一定となり、 $X_{pe}^0 > 0.52$ では X_{pe}^0 に対し直線的に減少している。これは、Fig. 4 の DPPC/C₁₂-E₇ 混合ミセルの場合と同様の結果を示している。ここで、屈折点の X_{pe}^0 値が異なるのは、レンチンの炭化水素鎖の長さの違いによるものであろう。

Fig. 8. Variation of the Logarithm of the Rate Constant with the Initial Mol Fraction of DMPC in Mixed Micelles containing DMPC and C_{12} -E $_7$

The logarithm of the rate constants were determined from Fig. 7.

Fig. 9. The Dependence of Activation Energy, E_0 , on X_{PC}^0

Fig. 10. Variation of the Cloud Point with Initial Mol Fraction of DMPC

(○), heating
(●), cooling
(△), the breaking point shown in Fig. 7.

考

察

膜を構成する脂質に対するリパーゼの反応は、界面により活性化されると言われる。⁸⁾ Phospholipase A の反応によると、基質が分子状態で分散している系にくらべ、ミセルを形成した会合系では、その反応性が極端に増強される。⁹⁾ このような場合、R. A. Deems らは、酵素分子と混合ミセルとの会合を考えた。¹⁰⁾ Phospholipase A₂

また、この直線の傾きから活性化エネルギーを求め、混合ミセルのレシチン初モル分率との関係を Fig. 9 に示す。活性化エネルギーは、レシチン初モル分率 X_{PC}^0 が 0.54 までは一定の値となるが、それ以上になると X_{PC}^0 に対し直線的に増加していく。

Fig. 7 のグラフにおいて、屈折点より高温の範囲では、Arrhenius 型 plot は、正の傾きを持つ直線となった。この直線の傾きは、ミセル組成に依らずほぼ一定の値となり、レシチン初モル分率が 0.5, 0.4 もそれぞれ別々の直線を作った。この範囲で混合ミセル溶液は白濁し、その濁り方は温度が高くなるにつれて大きくなることから、この現象は、ミセルへのレシチンの可溶性度の減少によるものと推定される。

Fig. 10 に、混合ミセル溶液の DMPC モル分率と曇点の関係を示した。また、Fig. 7 における屈折点も△印で示した。酵素反応の屈折点が混合ミセルの曇点と一致しているのがわかる。したがって、屈折点より高温領域での反応速度定数の低下は、レシチンのミセルへの可溶性度の減少に起因するものと結論した。

Fig. 11. (a) Schematic Diagram of the Average Structure of Mixed Micelles of Lecithin and C₁₂-E₇

(b) Schematic Diagram of the Action of Phospholipase D (E) toward Phospholipid (S) contained in Mixed Micelles (A) with Surfactants such as C₁₂-E₇

Phospholipase D would produce product (P), phosphatidic acid and choline.

についてのモデルと同様のことを、我々の研究に用いた phospholipase D についても考えると Fig. 11 のようになる。

ところで、レシチンおよび非イオン性界面活性剤分子の疎水性・親水性のバランス、分子の長さ、占有面積などがそれぞれ異なることから、両者の混合ミセルは、その組成によりミセル形が異なる可能性がある。スフィンゴミエリンとトリトン X-100 の混合ミセルにおける研究が報告されているが、ミセル組成によりミセル形が異なり、さらに2つの成分のミセル内での分布が不均一であるという。¹¹⁾ ここでは、トリトン X とレシチンの混合ミセルの場合¹⁰⁾と同様に、レシチンと非イオン性界面活性剤の混合ミセル中でも、両者は均一に混合していると考えた。酵素反応は、まず酵素とミセルの相互作用から始まる。この相互作用の性質は、単にミセル表面に吸着する場合と、phospholipase A₂ と短鎖レシチンミセルとのように、酵素の一部がミセル内部へ挿入される場合とが考えられる。^{12,13)} Phospholipase D の場合、phospholipase A₂ と異なり、基質の反応部位はミセルのかなり外側に存在すると思われるので、酵素の一部がミセル内部へ挿入される必要はないと思われるが、いずれにしろ、酵素がミセルに吸着することは確かであろう。界面に吸着した酵素は、ここで酵素-基質複合体を形成し、酵素反応がおこる。分解反応の終了後、反応生成物は放出されるであろうが、酵素に関しては、界面上を動いて次の基質と結合する過程と、脱離し溶液相へ拡散する過程が考えられる。¹⁴⁾

In α vs. t のグラフでみられた初期の遅い反応は、我々の実験条件では、レシチン分子同士が互いに強く packing した状態にあるため、酵素のミセルへの吸着が阻害されることに起因すると思われる。しかし、ある程度反応が進行し、ホスファチジン酸が生成されると、これが非イオン性活性剤と同様の作用をするため、酵素の吸着が有利となり、反応が速くなると考えた。つまり、混合ミセルのモル分率が大きい範囲では、レシチン分子の極性基同士が表面で密につまって酵素を寄せつけない部分が存在するが、ホスファチジン酸生成により表面の状態が変化し、酵素が吸着しやすくなったわけである。この境界となるレシチンモル分率は、レシチンにより異なり、転移点の低い DMPC の方が大きな値となったと思われる。これよりレシチンモル分率が小さくなると、酵素の吸着は packing による阻害をうけないので、酵素-基質複合体の活性化自由エネルギーにより反応速度が決定されることになる。

我々が行なった実験条件において、レシチン初モル分率により反応速度定数が変化した現象の原因の1つは、共存する非イオン性活性剤の影響であると考えられる。そこで、この効果をエネルギーの面から考察してみた。

活性化エネルギーと反応速度定数から、酵素-基質複合体の標準状態から活性化状態への活性化自由エネルギー、活性化エンタルピー、活性化エントロピーを求めた。反応速度定数 k から活性化自由エネルギー $\Delta G^\ddagger$ が

TABLE II. Effect of X_{pc}^0 on the Action of Phospholipase D at the Interface of Mixed Micelles containing DMPC and C₁₂-E₇

X_{DMPC}	$\ln k$	E_a (kcal·mol ⁻¹)	ΔG^* (kcal·mol ⁻¹)	ΔH^* (kcal·mol ⁻¹)	ΔS^* (e.u.)
0.40	-3.635	47.81	19.06	47.23	9.680
0.50	-3.635	47.81	19.06	47.23	9.680
0.55	-3.833	59.45	19.18	58.87	13.64
0.60	-4.125	88.09	19.40	82.31	21.62
0.70	-4.750	161.5	19.77	155.7	46.71

Fig. 12. Influence of Values of X_{pc}^0 on the Free Energy of Activation for the Action of Phospholipase D at an Interface

式 (3) を用いて、活性化エネルギーから式 (4) により活性化エンタルピー ΔH^* を、 ΔG^* , ΔH^* より活性化エントロピー ΔS^* を式 (5) から求められる。

$$\Delta G^* = RT[\ln(k_B \cdot T/h) - \ln k] \quad (3)$$

$$\Delta H^* = E_a - RT \quad (4)$$

$$\Delta S^* = (\Delta H^* - \Delta G^*)/T \quad (5)$$

R は気体定数, T は絶対温度, h は Plank 定数, k_B は Boltzman 定数である. DMPC/C₁₂-E₇ 混合ミセルの, 18°C におけるその計算結果を Table II に示す. 活性化自由エネルギー ΔG^* はレシチンモル分率が小さい程小さく, 反応が進みやすいことを示している. 活性化エンタルピーの減少はかなり著しく, レシチンモル分率による内部エネルギーの差が大きいことがわかる. レシチンモル分率の減少につれて活性化エントロピーは小さくなっており, このために活性化自由エネルギーの低下が抑制されている. Phospholipase D とレシチンの複合体

の活性化状態が, 界面のレシチンモル分率に依らず一定であるとする, つまり, 共存する非イオン性活性剤により複合体が影響を受けないとすると, この活性化自由エネルギーの違いは, 非イオン性活性剤とレシチンの相互作用によってレシチンの存在状態が変化し, レシチンの化学ポテンシャルがモル分率により異なるためにおこるものと考えられる。

以上の結果を総括し, 図式に表わしたのが Fig. 12 である. ここには, 反応の進行に伴う各々の過程のエネルギー状態を模式的に表わしてある. 転移点以下において, 純粋なレシチンは互いに packing しゲル状態で存在するが, 転移点以上になると液晶状態となる. 液晶状態にあるレシチンは, ゲル状態のものに比べ, エントロピー的にはより安定でありエンタルピー的にはより不安定であるといえる. レシチンと非イオン性界面活性剤の相互作用は, これとよく似た作用をするのではないか. すなわち, 転移点以下の純粋なレシチンに非イオン性活性剤を添加すると, レシチン同士の packing の中に活性剤分子が入りこみ, この両者間に相互作用がおこる. 活性剤と相互作用をおこしたレシチン分子は, エントロピーが増大し, エンタルピーが上がった液晶のような状態となる. また, 表面では極性基同士の作用がこわれ, 酵素が吸着しやすくなる. このようなレシチンとの複合体は, エネルギーが高く, したがって活性化自由エネルギーが小さくてすむと考えた. 非イオン性活性剤が多い程, すなわちレシチンモル分率が小さい程, その相互作用を受け液晶のような状態になるレシチン分子も多くなり, 全体としての反応速度が増大したと考えられる. また, すべてのレシチン分子が非イオン性活性剤の相互作用を受け, ある程度のエネルギー状態に達すると, それ以上非イオン性活性剤を添加してもレシチン分子のエネルギーは変わらない. これが, Fig. 4, 8, 9 において, 直線が横軸と平行になった部分に相当し, この範囲が, DMPC, DPPC により異なるのは, その炭化水素鎖の長さの違いによるものと考えられる。

引用文献および注

- 1) Present address : *Osaka College of Pharmacy, 2-10-65 Kawai Matsubara-shi, Osaka, 580 Japan.*
- 2) M. Nakagaki, I. Katoh, T. Handa, *Biochem.*, **20**, 2208 (1981).
- 3) T. T. Allgyer, M. A. Wells, *Biochem.*, **18**, 5348 (1979).
- 4) R.M.C. Dawson, N. Hemington, *Biochem. J.*, **102**, 76, (1967).
- 5) R.H. Quarles, R.M.C. Dawson, *Biochem. J.*, **113**, 697 (1969).
- 6) D.H. Haynes, *J. Memb. Biol.*, **17**, 341 (1974).
- 7) a) J. A. F. op den Kamp, M. TH. Kauerz, L. L. M. van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta*, **406**, 169 (1975); b) C.R. Kensil, E.A. Dennis, *J. Biol. Chem.*, **254**, 5843 (1979).
- 8) P. Desnuelle, L. Sarda, G. Ailhand, *Biochim. Biophys. Acta*, **37**, 570 (1960).
- 9) W.A. Pieterse, J.C. Vidal, J.J. Volwerk, G. H. de Haas, *Biochem.*, **13**, 1455 (1974).
- 10) R.A. Deems, B.R. Eaton, E.A. Dennis, *J. Biol. Chem.*, **250**, 9013 (1975).
- 11) S. Yedgar, Y. Barenholz, V.G. Cooper, *Biochem. Biophys. Acta*, **363**, 98 (1974).
- 12) R. Verger, M.C.E. Mieras, G.H. de Haas, *J. Biol. Chem.*, **248**, 4023 (1973).
- 13) P.S. de Araujo, M.Y. Rorseneu, J.M.H. Kremer, E.J.J. van Zoelen, G.H. de Haas, *Biochem.*, **18**, 581 (1979).
- 14) D.O. Tinker, J. Wei, *Can. J. Biochem.*, **57**, 97 (1979).