リン脂質の多形に関する熱的研究 (第 2 報) L-ジパルミトイルフォスファチジル
エタノールアミンと水の混合系が示す多形

中垣正幸, 半田哲郎, 大橋佳代子

京都大学薬学部¹⁾

Thermal Studies on Polymorphisms of Phospholipids. II. Polymorphism of
L-Dipalmitoyl Phosphatidylethanolamine-Water Mixtures

MASAYUKI NAKAGAKI, TETSUROU HANDA, and KAYOKO OHASHI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University¹⁾

(Received November 20, 1978)

DSC curves of mixtures of synthetic L-dipalmitoyl phosphatidylethanolamine (DPPE) and water were measured for samples prepared in various conditions. The various kinds of phase transitions were detected and the values of transition temperature and transition enthalpy were obtained from the DSC curves. Between 30° and 145°, there are three lyotropic polymorphs, each with several thermotropic polymorphs. In the case of anhydrous DPPE, there is a quasi-stable noncrystalline solid phase which is easily annealed to a crystalline phase. In the case of mixtures, there are two hydrous forms of DPPE which have the hydration number of 1 and 8 respectively. On the basis of these results, the phase diagram of DPPE-water system was drawn.

Keywords—phosphatidylethanolamine; lyotropic polymorphism; thermotropic polymorphism; differential scanning calorimetry; hydration number; phase diagram

リン脂質は無水状態において、温度を変化させると液晶相などの種々の状態を示す。この温度変化による相状態の変化は熱的多形 (thermotropic polymorphism) と呼ばれている。一方、温度を一定に保っても水分含有量により異なる相状態を示す。これは lyotropic polymorphism と呼ばれている。こうしてリン脂質の状態は温度と水分の含有量により複雑に変化する。特に水分が飽和した系はラメラ相 (lamellar phase) と呼ばれ、脂質 2 分子膜が水層をはさんで何層も積み重なり合った構造を有している。脂質 2 分子膜は生体膜の基本構造でもあり、これに関連させてリン脂質の polymorphism が研究されている。^{2,3)} しかし、種々の相と相の間がどの様に関係づけられるかという相化学的性質については、特に phosphatidylcholine について⁴⁾ 以外は不明な点が多い。特に phosphatidylethanolamine は phosphatidylcholine と共に天然に広く分布するが、その無水物の持つ 2 つの結晶形と、これ等が加熱された時に共に示す 2 つの液晶形が知られている程度である。²⁾ 本研究では L-dipalmitoyl phosphatidylethanolamine (DPPE) の種々の含水量のサンプルについて示差走査熱量測定をおこない、その相化学的性質を明らかにする。

結 果

無水系の熱的測定

L-Dipalmitoyl phosphatidylethanolamine (DPPE) を直径 6 mm, 深さ 2 mm のアルミニウム製の容器に入れ、蓋をして示差走査熱量計 (DSC) により温度変化に伴う発吸熱を測定し、相変化を検出した。

- 1) Location: Yoshida-Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto, 606, Japan.
- 2) a) R.M. Williams, D. Chapman, "Phospholipids, Liquid Crystals and Cell Membranes, Progress in Chemistry of Fats and Other Lipids," Vol. 11, Oxford, London, 1970; b) V. Luzzati, F. Husson, *J. Cell. Biol.*, **12**, 207 (1962); c) A. Tardieu, V. Luzzati, *J. Mol. Biol.*, **75**, 711 (1973); d) D. Chapman, R.M. Williams, B.D. Ladbroke, *Chem. Phys. Lipids*, **1**, 445 (1967); e) D. Chapman, P. Byrne, G. Shipley, *Proc. Roy. Soc. London*, **A290**, 115 (1966).
- 3) 中垣正幸, 半田哲郎, 大橋佳代子, 薬誌, **99**, 1 (1979).

Fig. 1. DSC Curves of DPPE

The samples were vacuum desiccated at 75° for 5 hours. Heating to 130° (1), cooling from 130° (2) and reheating to 130° (3). Heating to 145° (4), cooling from 145° (5) and reheating to 145° (6). (1), (2), (3), 5°/min; (4), (5), (6), 10°/min.

Fig. 2. DSC Curves of DPPE

The samples were once heated to 145°, and then annealed in vacuum. (1) annealed at 75° for 3 hours. (2) Annealed at 75° for 15 hours. (3) Annealed at 65° for 15 hours. (4) Annealed at 90° for 15 hours. 10°/min.

Fig. 1 の (1)―(3) は、DPPE を 75° で 5 時間真空乾燥した後、30° より 130° まで昇温し (1)、ひきつづき 130° より 30° まで降温させ (2)、さらに、130° まで昇温させた時 (3) の DSC の測定結果である。(1) では 95°, 109° にそれぞれ吸熱ピークが、(2) では 51° に発熱ピークが、(3) では 51° に吸熱ピークが見出された。(4)―(6) は同様な試料を 30° より 145° まで昇温 (4)、次に 30° まで降温 (5)、再び 145° まで昇温 (6) した時の結果である。(4) では 95°, 109°, 136° に吸熱ピークが、(5) では 123°, 51° に発熱ピークが、(6) では 51° と 135° に吸熱ピークが見出された。(1)―(3) と (4)―(6) の比較により、上限温度を 130° より 145° まで上げる事により、136° と 123° に吸発熱ピークが新たに出現する事がわかった。すなわち、145° まで一度、昇温すれば、95° や 109° のピークは消え去り、昇温時は 51° と 135° に吸熱ピークが、降温時には 123° と 51° に発熱ピークがあらわれるだけとなった。

次に、一度 145° まで昇温させた試料を真空乾燥器中で一定温度で焼なましした後、DSC の測定をおこなった結果を Fig. 2 に示した。

(1) は 75° で 3 時間の焼なましを行なったもので、52° と 135° に吸熱ピークを示す。これは Fig. 1 の (6) とほぼ同じ結果である。しかし、(2) が示す様に 75° で 15 時間の焼なましを行なうと、51° の吸熱ピークは小さくなり 98° に新たなピークが現れた。65° で 15 時間の焼なましを行なっても (3) が示す様に 96° に新しく吸熱ピークが生じ、51° のピークは完全になくなった。一方、90° で 15 時間の焼なましをおこなっても (4) が示す様に 51° のピークはあまり変化せず (ややブロードになる。), また、95° 付近にも新しい吸熱ピークはあらわれない。20° 付近の室温にて、真空中または大気中で 20 日間放置しても、51° のピークは変化せず、95° 付近に吸熱ピークも現れてこなかった。すなわち、65° 付近で焼なます事により 95° の吸熱ピークが現れ、これより低温でも高温でも焼なましの効果が小となった。今まで焼なましはほとんど真空中でおこなったが、湿った空気中では次の様になった。Fig. 3 の (1) は一度、145° まで昇温した試料を室温 (約 20°), 大気中にて 20 日間放置した後 DSC を測定した結果である。51° のピークが少し変化したと考えられる 54° のと 138° の吸熱ピークが現れるの

Fig. 3. DSC Curves of DPPE

The samples were once heated to 145°, and then annealed. (1) Annealed at room temperature in atmosphere for 20 days. (2) Annealed at room temperature in moist atmosphere for 15 hours. (3) Annealed at 40° in moist atmosphere for 2 hours. (4) Annealed at 60° in moist atmosphere for 2.5 hours. (1), 5°/min; (2), (3), (4), 10°/min.

Fig. 4. DSC Curves of Mixture of DPPE and Water

Heating to 74° and cooling.

Fig. 5. The Change of Transition Temperature during the Repeated Operations of DSC

The sample is the same as used in Fig. 4.

みであった。次に、一度、145°まで昇温したサンプルを水を満たしたビーカーと共に同じ容器に入れ、蓋を閉じて容器全体を一定温度に保ち、なまして DSC を測定した。なます間、サンプルは水蒸気が満たされた空気中にある。(2)はこの様にて室温(約 20°)で 15 時間なましたものの測定結果である。90°付近にわずかにピークが現れてきた。40°で 2 時間なまして (3)の様に 94°にわずかにピークが現れてきた。60°で 2.5 時間なますと (4)の様に 51°ピークは完全に消え 93°にピークが現れた。すなわち、湿った空気中にある方が真空中より早く、また、より低温でもより早くなまされる事がわかった。

DPPE と水の混合系の熱的測定

水浴上でアルミニウム容器中の DPPE を 65°に加熱し、水を加えるとサンプルは膨潤し透明に近くなった。これを冷やすと白色ゲル状となった。このサンプルの DSC 測定結果を Fig. 4 に示した。20°→75°と昇温させ、次に 20°まで降温した。昇降温共に 64.5°にて吸発熱ピークを示した。ピーク面積より熱量変化として 6.6 kcal/mol を得た。サンプルは蓋と容器の間に隙間のある開放型容器中にあるので、昇降温を連続的に繰り返す間に水分が徐々に失われ、これに伴い DSC のピークの位置が変化していった。この様子を示したのが Fig. 5 である。水を加えたのち、始めの 2 回の昇降温では 64.5°にピークが現れた。次に、これは消え 82°のピークが現れた。95°までの昇降温の時、場合により、64.5°と 82°のピークが同時に現れる事もあり、64.5°と 82°のピークは相いれないものではない事もわかった。82°のピークが小さくなって行くと、まれには 52°のピークが同時に現れる事もあったが、多くの場合、前者が消えてから 52°のピークが出現した。昇降温毎にセミマイクロ天秤で試料の重量を測り、DPPE 1 分子当りの水分子数 (n_{H_2O}/n_{DPPE}) を求めたが、(n_{H_2O}/n_{DPPE}) > 8 では 64.5°のピークのみが、 $8 > (n_{H_2O}/n_{DPPE}) > 1$ では 81°と 64.5°の 2 つのピークを見出した。Run 5 では含水量は 0 となっているが、20°より 145°までの昇温にて、52, 92, 135°にピークが現れ、Fig. 3 の (2) や (3) とよく似た結果となった。この後は降温では 121°と 52°、昇温では 52°と 135°にそれぞれ吸発熱のピークが現れ、Fig. 1 の (5) と (6) の様な乾燥したサンプルが示す測定結果と一致した。

考

察

無水系の熱的多形

Phosphatidylethanolamine の多形の研究は X 線小角散乱法や示差熱分析 (DTA) などによりなされている。それ等は、また、一種の混合物である D,L-phosphatidylethanolamine を用いてなされているが、いくつかの相の存在と構造が研究されている。^{2a,4)}しかし、相化学的性質の全体像についてはほとんど不明である。Fig. 1 よりわかる様に無水 DPPE は 95°と 109°および 135°(降温時は 123°)の 3 種の変相変化点を有する。一度、145°

4) a) J.B. Finean, *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 371 (1953); b) J.B. Finean, P.F. Millington, *Trans. Farad. Soc.*, **51**, 1008 (1955); c) A. Van Veen, P.E. Verkade, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **79**, 1085 (1960).

まで昇温させると 95° と 109° のピークは消え 52° に新たな相変化点を生ずる。Fig. 2 より、 65° 付近でなます事により 51° の相変化点のピークは小さくなり、 95° 付近のピークが回復する事がわかる。また、Fig. 3 より湿度が高い大気中では、この 95° 付近のピークの回復は促進される事がわかる。D. Chapman 等によると、phosphatidylethanolamine にはより結晶性が高い A' 形とこれより結晶の構造規則性が弱い A 形が存在すると考えられている。前者はクロロホルムとメタノールの 1 対 1 の混合溶媒、後者はエタノールより再結晶されると報告している。A' は 115° 付近に、A は 90° 付近に液晶相への転移点を有すると報告されている。^{2a), b)} これに従うと、Fig. 1 の 95° 付近のピークは A 形 (本論文では C' とする)、また、 109° のピークは A' 形 (本論文では C とする) の液晶相 (LC_1 とする) への転移を示すものである。また、 LC_1 は 136° にて別の構造の液晶 (LC_1' とする) に相変化する事がわかる。降温の時、 $LC_1' \rightarrow LC_1$ の相変化は過冷却を伴い 121° でおきる。C, C', LC_1 さらに LC_1' はいずれも層状構造を有し、その 1 つ 1 つの層の厚さは DPPE について、C や C' で $56 \text{ \AA}$, LC_1 で $37 \text{ \AA}$, LC_1' で $32 \text{ \AA}$ と報告されている。^{2d)} すなわち、C や C' では互に向き合って配向する脂質の疎水基は伸びきった固体状態に、 LC_1 や LC_1' では液体状態にある。 LC_1 と LC_1' の差についてはあまりわかっていない。また、phosphatidylethanolamine はその疎水基の化学的性質にあまり関係なく 200° 付近で等方性液体に変化するとされている。⁵⁾ 以上の事柄は今までにある程度は明らかにされていたものである。^{2, 4)} 以下に述べる事は本研究で初めて明らかになるものである。すなわち、Fig. 1 が示す様に C や C' は一度、 $130-140^\circ$ に加熱されれば消滅し、新しい相 (S_1 とする) が LC_1 の冷却より生じる。 $S_1 \rightarrow LC_1$ の相変化は 51° である。 S_1 は安定相でなく、 65° 付近で焼なまされ C' に変化する。この $S_1 \rightarrow C'$ の変化は湿った空気中で促進されるが、これは水分子が親水基間の分子間力を緩和し、脂質分子の相互の運動性を助長するためであろう。 S_1 は熱力学的に準安定なものであるが、 LC_1 をすみやかに冷却すれば 51° で S_1 が析出し、また、 S_1 を加熱すれば 51° で LC_1 に相変化する。 S_1 については今までも報告はされていないが、phosphatidylcholine の場合³⁾ から類推すると、非結晶性の固体相である事が予想される。C' のみならず C もまた相変化して一度 LC_2 になると、これを冷やしても元にもどらず S_1 が析出する。C は混合溶媒より得られると報告されていた^{2a)} が、我々が確めて見ると、DPPE を混合溶媒より再結晶してもエタノールから再結しても C' しか得られなかった。C は購入後、無処理かそれを 75° で真空乾燥したサンプルにのみしか見出せなかった。なお、C の形成は極めてまれにしかおこらないと言う報告もある。^{4b)}

DPPE と水の混合系の多形

リン脂質は一定以上の水と共存する時、2 分子膜を形成する。ラメラ相は 2 分子膜が水層をはさんで重なったものである。脂質の種類により異なるが、2 分子膜は特定の温度以下では膜の疎水基部分は固体状態 (S_3) に、それ以上では液体状態 (LC_3) にある事はよく知られている。Dipalmitoyl phosphatidylcholine ではこの $S_3 \leftrightarrow LC_3$ の転移温度は 41° である。^{2, 3)}

DPPE の場合は Fig. 4 に示した様に 64.5° にて $S_3 \leftrightarrow LC_3$ の転移がおこる。この事実はよく知られたものであるが、この含水試料を昇降温させ、水分の減少に伴う性質の変化を追跡した結果について述べる。水分減少により、 64.5° の次に 82° の相変化点が非連続的に現れる。さらに、水分減少により 52° と 92° と 135° に相変化点が生ずる。この後の DSC の結果は無水系と一致する。すなわち水分が十分にあると、($n_{H_2O}/n_{DPPE} > 8$), 64.5° より低温で S_3 、高温で LC_3 相で存在する。水が不足すると一部は水和数の少ない S_2 や LC_2 で存在する様になる。 $S_2 \leftrightarrow LC_2$ の相変化温度は 82° である。 S_2 や LC_2 に関する報告は今までないが、本研究より ($n_{H_2O}/n_{DPPE} \approx 1$) と考えられる。また、DPPE 単分子膜を累積させると一部脱水して水和数がほぼ 1 の相が形成される事もわかっている。⁶⁾ さらに水分が失われると (Fig. 5 の Run 5), S_1 , C' が現れ、それぞれ、 52° と 92° にて LC_1 に転位する。 LC_1 はさらに 135° で LC_1' に変化する。また、 LC_3 や S_3 の水和数に関しても報告はないが、本研究では ($n_{H_2O}/n_{DPPE} \approx 8$) である事がわかった。Phosphatidylcholine の場合、 S_3 や LC_3 は水和数が最大 10 である事がわかっている^{3, 7)} が、水和数に一定の幅を有し、これに伴い $S_3 \leftrightarrow LC_3$ の相変化温度は連続的に変化する

5) G.H. DeHaas, L.L.M. Van Deenen, *Rec. Trav. Chim. Pay Bas*, **88**, 951 (1961).

6) 清宮 懋, 鈴木啓太郎, 木村治彦, 村松三男, 井上文英, 第 2 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2B05, 京都, 1978.

7) a) A.D. Keith, W. Snipes, D. Chapman, *Biochemistry*, **16**, 634 (1977); b) G.C. Newman, C.H. Hung, *Biochemistry*, **14**, 3363 (1975).

Fig. 6. The Relation between Various Polymorphs of DPPE

る.³⁾ これに対して DPPE の場合は, Fig. 5 から判断される様に $S_3 \leftrightarrow LC_3$ の転移温度は 64.5° に確定し, 乾燥過程でこの相変化の発吸熱ピークは何分の 1 にも小さくなっていく。

DPPE と水の混合系の相図

今までの結果をまとめて, それぞれの相の関係を示すと Fig. 6 の様になる. すなわち, C や C' は 109° および 95° にて LC_1 に転移する. LC_1 は 135° にて LC_1' に相変化する. また, LC_1 を冷却しても C や C' は析出せず S_1 が析出する. $S_1 \leftrightarrow LC_1$ の相変化は常に 51° であり, その転移エンタルピー (Δh_1) は 6.7 kcal/mol である. $(n_{H_2O}/n_{DPPE}) > 8$ の時, S_3 が形成されているが, $S_3 \leftrightarrow LC_3$ の転移エンタルピー (Δh_3) は 6.6 kcal/mol である. 水分が減少していくと S_2 や LC_2 が形成される. さらに乾燥されると S_1 や LC_1 が形成される. DPPE は吸湿性が強く, 低温側では水分の存在で $S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3$ と, 高温側では水分を失い $LC_3 \rightarrow LC_2 \rightarrow LC_1$ と変化する事も今までの結果よりわかった。

Fig. 6 にて出現する種々の相の名付け方を他の研究者によるものと比較し, Table 1 に示した。

DSC 測定による相変化温度, 試料の秤量による水分含量, および, 相律にもとづいて³⁾ DPPE と水の系に対し, 相図を描くと Fig. 7 の様になる. 縦軸は温度 (T), 横軸は DPPE 1 分子当りの水分子の数 (n_{H_2O}/n_{DPPE}) である. 全ての組成と温度範囲にわたり測定値を得る事は不可能に近く, この点からみれば Fig. 7 は定性的である. 無水の DPPE は低温側で C, C' と S_1 が共存する時がある. この共存は系が非平衡状態にあるためである. S_1 は準安定相である事がわかった. また, C が C' より結晶の規則性も高い事^{4d)} から真の熱力学的安定相

Fig. 7. The Phase Diagram of Mixtures of DPPE and Water

T, temperature; (n_{H_2O}/n_{DPPE}), the number of H_2O molecules per one DPPE molecule. (ab), $(C + C' + S_1)$; (bc), $(C + C' + LC_1)$; (cd), $(C + LC_1)$ (de), LC_1 ; (ef), LC_1' ; (gh), S_1 ; (hi), LC_2 ; (jk), S_3 ; (kl) LC_3 .

TABLE I. The Nomenclatures of the Polymorphs of Phosphatidyl Ethanolamine

	This study	D. Chapman ^{2e)}	J.B. Finean ^{4a)}	VanVeen ^{4c)}
Anhydrous crystal 1	C	A'	B	β'
Anhydrous crystal 2	C'	A	A	β
Anhydrous noncrystalline solid	S_1			
Anhydrous liquid crystal 1	LC_1	B		
Anhydrous liquid crystal 2	LC_1'	C	C	
Hydrated noncrystalline solid	S_2			
Hydrated liquid crystal	LC_2			
Hydrated lamellar of solid state	S_3	Gel of hydrated lamellar		
Hydrated lamellar of liquid state	LC_3	Mesomorphic hydrated lamellar		

は C と考えられる。この様な準安定相の出現は phosphatidylcholine でも見出せる。³⁾

本研究は phosphatidylethanolamine (PE) として DPPE を用いた。この結果を PE 一般に単純に拡張できない。PE に似た構造の phosphatidylcholine の場合、疎水基の長さが異なっても相図の縦軸の値 (温度) が変化するのみで相図全体の様子はあまり変化しない。³⁾ これを参考にすると distearoyl, dimyristoyl や dilauroyl phosphatidylethanolamine などの様に DPPE に近いものは同様な相図を有すると予想される。しかし、疎水基に不飽和結合が入ると phosphatidylcholine で予想される様に特に水分含量が小の部分で相図が著しく変化すると考えられる。²⁾ DPPE を phosphatidylcholine (PC) に比較して見ると、 $S_3 \leftrightarrow LC_3$ の転位温度は前者は一定、後者は幅を有する事、又、PC は $S_1 \leftrightarrow LC_1 \leftrightarrow$ 等方性液体と変化するが、DPPE は $S_1 \leftrightarrow LC_1 \leftrightarrow LC_1' \leftrightarrow$ 等方性液体と変化する。さらに、DPPE は結晶状態として C と C', PC は 1 つだけである。³⁾

実 験 の 部

試料 L-Dipalmitoyl phosphatidylethanolamine (DPPE) は Carbiochem 社製を用いた。薄層クロマトグラフィで検出されるスポットは単一であった。

DSC の測定 測定は島津熱分析 30 を用いた。昇温速度は $5^\circ/\text{min}$, または, $10^\circ/\text{min}$ とした。また、相変化熱はパルミチン酸の融解熱を基準にしてピーク面積より求めた。

DPPE と水の混合系の調製 DPPE をアルミニウム製容器 (直径 6 mm, 深さ 2 mm) に 3—6 mg 測りこみ, 65° の水浴上で蒸留水をガラス製キャピラリーより一滴加え膨潤させた。

謝辞 本研究は文部省科学研究補助金 (231940025672) によった。