Netsu Sokutei **44** (3), 101-107 (2017)

解　　説

コレステロールが誘起する脂質膜側方相分離の熱力学的考察

玉井 伸岳，後藤 優樹，松木 均

徳島大学大学院 社会産業理工学研究部 生物資源産業学域

（受取日：2017 年 4 月 26 日，受理日：2017 年 6 月 9 日）

Thermodynamic Consideration on Cholesterol-Induced Lateral Phase Separation within Lipid Bilayer Membranes

Nobutake Tamai, Masaki Goto, Hitoshi Matsuki

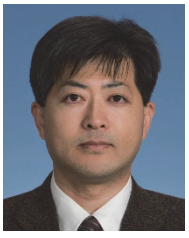
Division of Bioscience and Bioindustry
Graduate School of Technology, Industrial and Social Sciences, Tokushima University

(Received Apr. 26, 2017; Accepted Jun. 9, 2017)

We have so far studied the effect of cholesterol on the bilayer phase behavior of a homologous series of symmetric linear phosphatidylcholines (C*n*PCs) with different chain lengths (n = 14–18) by means of high-sensitivity differential scanning calorimetry and fluorescence spectroscopy using 6-propionyl-2-(*N*,*N*-dimethylamino)naphthalene (Prodan) as a membrane probe. The temperature–cholesterol composition (X_{ch}) phase diagrams constructed for these binary bilayers indicated several important characteristic of the phase behavior of them. First, the phase diagrams are similar to those for the liquid/solid phase equilibria of general binary mixtures that exhibit incongruent melting behavior, suggesting that cholesterol and C*n*PC molecules are essentially immiscible within the binary bilayer. Second, a characteristic point like a peritectic point appears on the phase diagram, suggesting that cholesterol has a propensity to form a molecular cluster with its surrounding C*n*PC molecules. The X_{ch}-dependent phase behavior indicated by the phase diagrams, especially cholesterol-induced lateral phase separation, was successfully explained by introducing the so-called *superlattice view*. In addition, this view allowed us to consider the relationship between the extent of the cholesterol effect and the hydrocarbon-chain length of the host C*n*PC molecules.

Keywords: cholesterol, incongruent melting, lateral phase separation, lipid raft, phase diagram, phospholipid bilayer.

玉井 伸岳
Nobutake Tamai
E-mail: tamai@tokushima-u.ac.jp



松木 均
Hitoshi Matsuki
E-mail: matsuki@tokushima-u.ac.jp

後藤 優樹
Masaki Goto
E-mail: goto@tokushima-u.ac.jp

© 2017 The Japan Society of Calorimetry and Thermal Analysis

1. はじめに

両親媒性分子であるリン脂質は水中に分散させると，一般にベシクルあるいはリポソームと呼ばれる二分子膜状の分子集合体を自発的に形成する。生体膜の基本構造がリン脂質二分子膜であることから，人工的に作製したリン脂質二分子膜は半世紀以上に亘って生体膜モデルとして多用されてきた。その結果，代表的なリン脂質の１つであるジパルミトイルホスファチジルコリン（C16PC）の形成する二分子膜では，温度上昇に伴い，ラメラゲル（$L_{\beta'}$）相からリップルゲル（$P_{\beta'}$）相への前転移，さらに $P_{\beta'}$相から液晶（L_{α}）相への主転移を起こすことが明らかにされている。ゲル相間の転移である前転移は，膜内でのリン脂質分子のパッキングの変化に対応し，二分子膜表面がフラットなパッキング状態（$L_{\beta'}$相）から波打ったパッキング状態（$P_{\beta'}$相）へと変化する。一方主転移は，リン脂質分子の炭化水素鎖部分の融解（*trans–gauche* 異性化）に起因し，L_{α}相の状態になると膜の流動性（膜中でのリン脂質分子の側方拡散）が著しく上昇する。

最近のモデル膜研究では，リン脂質とコレステロールからなる多成分系二分子膜がしばしば用いられる。これは単にコレステロールが細胞膜の主成分の一つであるからだけではなく，1990 年代後半に新しい細胞膜モデル，所謂ラフト仮説 [1]が提唱されたことに起因する。このモデルによると，細胞膜中にはスフィンゴ脂質など特定のリン脂質とコレステロールからなる「脂質ラフト」と呼ばれるミクロドメインが存在し，それがシグナル伝達など細胞の生物学的機能と密接に関連していると考えられている。しかし，ラフト自体は未だに正確に捉えられてはいない。

リン脂質二分子膜の構造・物性におよぼすコレステロールの影響については比較的古くから研究されており，膜の流動性や炭化水素鎖の秩序性に与える影響など膜中におけるリン脂質分子の物理化学的特性に関しては比較的初期の研究により明らかにされている。[2,3] 一方，リン脂質分子の膜中における組織化状態，すなわち二分子膜の相状態におよぼす影響については， 1980 年代初頭にコレステロールがリン脂質二分子膜内で側方相分離を誘起することが見出され，[4] その後，Ipsen ら [5] によりコレステロール含有二成分リン脂質二分子膜に対する理論相図が報告されるまで，長い間不明であった。彼らは単純なモデルに基づく理論計算により， C16PC–コレステロール二成分二分子膜の相境界線を予測し，高コレステロール組成域において秩序固体（S_o）相と無秩序液体（L_d）相との中間的な相状態，すなわち秩序液体（L_o）相が形成されることを見出した。なお，S_o相および L_d相は、ステロールを含む混合二分子膜でしばしば用いられる名称であり，それぞれリン脂質の炭化水素鎖の秩序性が高く流動性が低い膜状態ならびに炭化水素鎖の秩序性が低く流動性が高い二分子膜状態に対応する。したがって，上述の $L_{\beta'}$相や $P_{\beta'}$相などのゲル相は S_o相に，L_{α}相は L_d相に包含されると考えて差し支えない。二分子膜内に完全に L_o相が形成されると，リン脂質分子の炭化水素鎖の融解が抑制され，明確な主転移を示さなくなる。数年後, Vist と Davis [6] が同系に対する実験相図を報告し，定性的には Ipsen らの理論相図に一致することが示された。これを皮切りに，1980 年代後半から 1990 年代にかけてコレステロール含有二成分リン脂質二分子膜の相図に関する研究が集中的に行なわれたが，系統的な研究が全くと言っていい程なされなかったこともあり，未だに統一的理解には到っていない。[7]

このような状況を踏まえ，近年我々は炭化水素鎖長の異なる５種類の飽和ジアシルホスファチジルコリン（C*n*PC, n = 14–18）の相挙動におよぼすコレステロールの効果の解明に取り組んできた。[8–10]本稿では，これらの作成した相図をもとに，コレステロールが誘起するリン脂質二分子膜内での側方相分離挙動に関する我々の新たな考え方を紹介すると共に，コレステロール効果と二分子膜を形成するリン脂質分子の炭化水素鎖長 n との関係についても概説する。

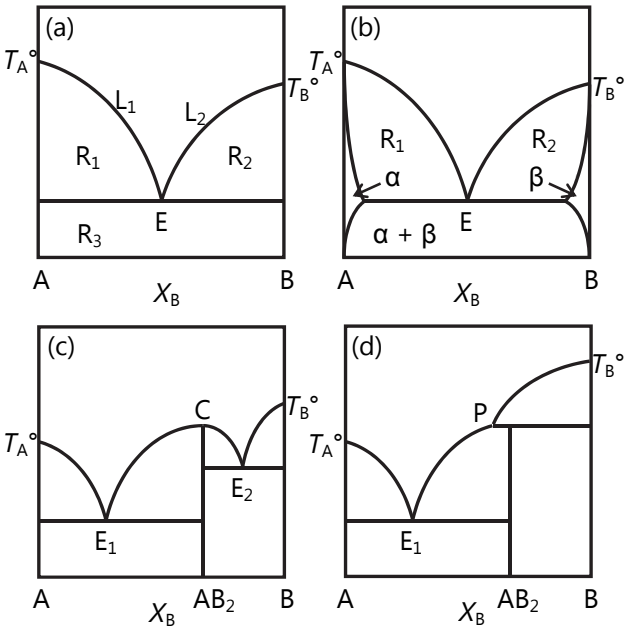


Fig. 1　Typical phase diagrams for various types of binary mixtures of A and B: (a) eutectic ideal binary mixture, (b) eutectic binary mixture where A and B are partially miscible in a solid state, (c) binary mixture that exhibits congruent melting behavior, (d) binary mixture that exhibits incongruent melting behavior.

2. 二成分混合系の固液相平衡

二成分混合系の固液相図の典型例を幾つか取り上げ，その基本的な特徴について熱力学的観点から説明しよう。**Fig.1(a)**には，成分 A，B が液体状態では完全に混和し（完全溶液），固体状態では完全に非混和である理想的な二成分混合物 A–B に対する固液相図を示している。図中の相境界線 L_1 と L_2 は液相線と呼ばれ，それぞれ， A と B の凝固点降下曲線に等しい。したがって，例えば L_1 の場合，混合物中における A の凝固点 T_A と B のモル分率 X_B の関係は次式で表される。

$$\ln\left(1-X_{\mathrm{B}}\right)=\frac{\Delta H^{\circ}_{\mathrm{f,A}}}{R}\left(\frac{1}{T_{\mathrm{A}}}-\frac{1}{T^{\circ}_{\mathrm{A}}}\right) \tag{1}$$

ここで, R と $\Delta H_{\mathrm{f,A}}$ はそれぞれ気体定数および A のモル融解エンタルピーであり，°印は純物質の熱力学量であることを表す。曲線 L_1（または L_2）より低い温度では純物質 A（または純物質 B）の固体が析出し始める。つまり，領域 R_1 および R_2 はそれぞれ，固体 A と溶液 A–B の二相共存状態および固体 B と溶液 A–B の二相共存状態に対応する。曲線 L_1 と L_2 の交点 E は共融点と呼ばれ，その温度以下では混合物 A–B は完全に固体の状態となる。つまり，領域 R_3 は固体 A と固体 B の二相共存状態に対応する。

A と B が固体状態で部分的に混和するとき，混合物 A–B は **Fig.1(b)**に示したような固液相平衡を示す。図中のα相とβ相はそれぞれ固体 A 中に少し B の混ざった固溶体 A–B（均一相）および固体 B 中に少し A の混ざった固溶体 B–A（均

一相）であり，領域α＋βはこれら２種類の固溶体の二相共存状態に対応する。領域 R_1 とα相（または領域 R_2 とβ相）との境界線は固相線，α相（またはβ相）と領域α＋βとの境界線は固溶度線と呼ばれる。**Fig.1(a)**と **1(b)**の比較から明らかなように，相図上に固相線および固溶度線が現れるか否かにより，固体状態での成分 A と B の混和性を判断できる。

合金や水和結晶の二成分混合物では，二成分が反応して，ある決まった化学組成比をもつ固体化合物が形成されることがしばしばある。**Fig.1(c)**と **1(d)**には，固体化合物 AB_2 が形成される場合の二成分混合物 A–B の固液相図を示している。いずれの場合も，固体化合物 AB_2 があたかも第三の化学種であるかのごとく振舞うため，化合物の化学組成比に対応した混合組成（$X_B = 0.67$）に等組成線が現れるのが特徴である。**Fig.1(c)**の固液相図の場合，固体化合物 AB_2 が点 C の温度で融解すると，化学組成比と同じ混合組成の溶液が生じることから，その融点である点 C を調和融点と呼ぶ。全体の相挙動は，**Fig.1(a)**に示したタイプの固液相図が $X_B = 0.67$ を境に並列し，$0 \le X_B \le 0.67$ では A と AB_2 との混合物の固液相平衡に，$0.67 \le X_B \le 1$ では AB_2 と B との混合物の固液相平衡に対応すると考えれば容易に理解できる。一方，固体化合物 AB_2 の融点と比較して純物質 B の融点が著しく高い場合は，調和融点は観測されず，**Fig.1(d)**に示した固液相図のような融解挙動を示す。この場合，固体化合物 AB_2 が融解すると，点 P の組成に対応した溶液が生じるため，溶液の混合組成と固体化合物の化学組成比は一致しない。このことから，点 P は非調和融点と呼ばれる。あるいは、包晶点ということもある。全体の相挙動は，**Fig.1(c)**の固液相図における B の凝固点降下曲線（曲線 T_B°E_2）が高温側へ移動したと考えれば容易に理解できる。

3. 二成分二分子膜の相転移観測

コレステロールを含む二成分 C*n*PC 二分子膜の相転移観測には，示差走査熱量（DSC）測定および Prodan 蛍光スペクトル測定を適用した。前者は一般的な熱分析法であり，二分子膜相転移の温度およびエンタルピー変化ΔH を決定できる。後者は，様々なリン脂質二分子膜の相挙動観測に有効な測定法である。Prodan は周囲の極性変化に敏感に応答する膜プローブであり，[11]一般に，周囲の極性が低くなるにつれて蛍光極大を示す波長λ_{max} が低波長側へとシフトする。[12]リン脂質二分子膜中では，相転移に伴い膜のパッキング状態が変化し，Prodan の配向位置（深さ方向）が変化するため，λ_{max} が大きく変化する。[13]これまでの研究から，L_β'相や P_β'相ではλ_{max} は 430–440 nm に，L_α相では 480–490 nm に現れることがわかっている。[13]さらにこの Prodan は，コレステロール含有二成分リン脂質二分子膜に対しても膜プローブとして有効に機能する。[14]

Fig.2(a)にはコレステロール組成 X_{ch} の異なる一連の二成分 C16PC 二分子膜に対する DSC 測定の結果を示している。なお X_{ch} は膜中におけるコレステロールのモル分率で，コレステロールのモル数 n_{ch} とリン脂質のモル数 n_{PC} を用いて次式で与えられる。

$$X_{ch} = n_{ch} / (n_{PC} + n_{ch}) \qquad (2)$$

コレステロールを含まない場合（curve 1，$X_{ch} = 0$），34.5 °C に非常に小さい吸熱ピークと 41.6 °C に非常に鋭い明確な吸熱ピークが見られる。これらは，それぞれ L_β'相から P_β'相への前転移と P_β'相から L_α相への主転移に対応する。コレステロールが取り込まれると，$X_{ch} = 0.07$（curve 2）では前転移に対応する吸熱ピークはほとんど観測されなくなり，主転移の吸熱ピークも明らかに小さくなることがわかる。また，図中に示した拡大図からわかるように，主転移のピークは非対称になっており、このことから主転移のピークは少なくとも二つの要素を含んでいることが示唆される。さらにコレステロールの組成が増加すると，この二つのピーク要素はほぼ同程度の大きさになり（$X_{ch} = 0.14$, curve 3），さらにコレステロールが増加すると，高温側のブロードな要素のみが観測されるようになる（$X_{ch} = 0.21$，curve 4）。$X_{ch} = 0.30$（curve 5）では，主転移ピークは非常にブロード

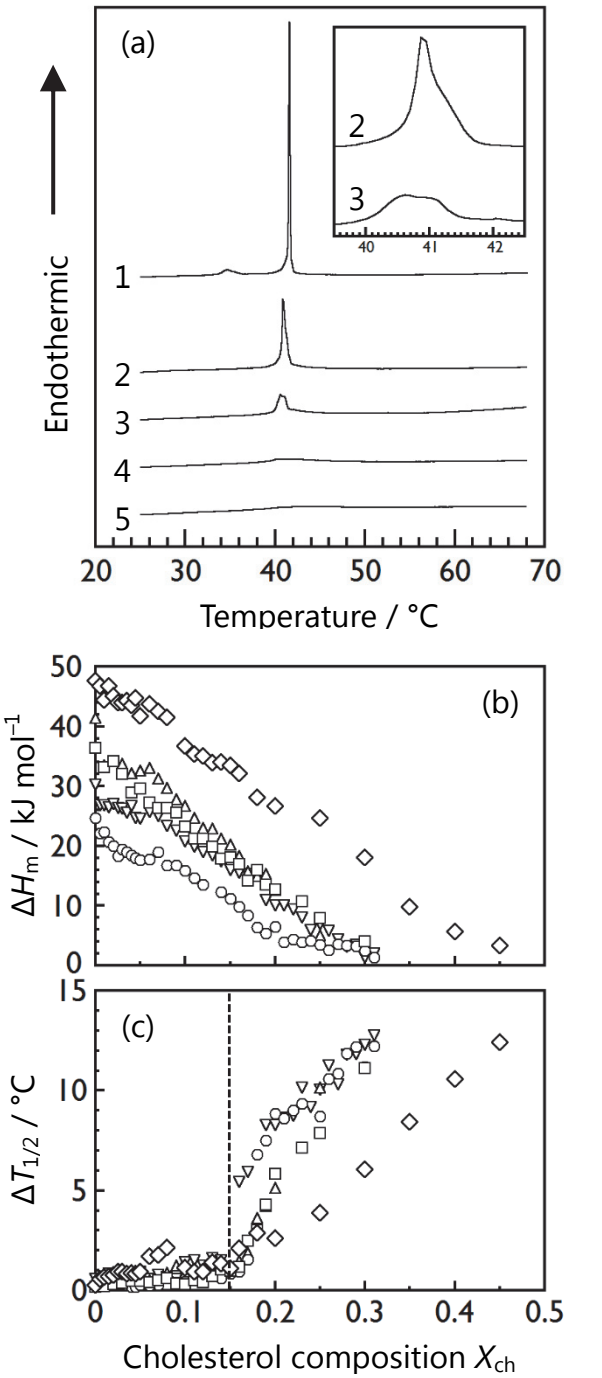


Fig. 2 (a) DSC thermograms of C16PC–cholesterol binary bilayer at different cholesterol compositions (X_{ch}): (1) X_{ch} = 0, (2) 0.07, (3) 0.14, (4) 0.20, (5) 0.30. Magnified view of the endothermic peaks of curves 2 and 3 is shown in the inset. (b) X_{ch} dependence of main-transition enthalpy ΔH_m for C*n*PC–cholesterol binary bilayers. (c) X_{ch} dependence of peak width at half height $\Delta T_{1/2}$ for C*n*PC–cholesterol binary bilayers. A broken line is drawn at X_{ch} = 0.15. In panels (b) and (c), different symbols are used to distinguish the data for each of the binary bilayers of C*n*PCs: (○) C14PC, (▽) C15PC, (□) C16PC, (△) C17PC, (◇) C18PC.

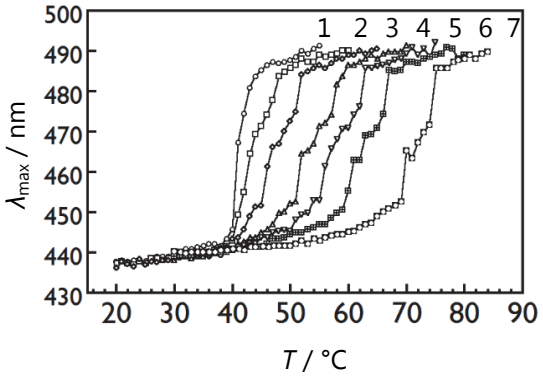


Fig. 3　Temperature dependence of wavelength at maximum emission λ_{max} observed in the Prodan fluorescence spectra for C16PC–cholesterol binary bilayer at different cholesterol compositions (X_{ch}): (1) X_{ch} = 0.01, (2) 0.05, (3) 0.10, (4) 0.15, (5) 0.19, (6) 0.24, (7) 0.31.

で不明瞭になり，最終的に X_{ch} = 0.35 では測定温度範囲において明確なピークが観測されなくなる。一連の X_{ch} の増加に伴う DSC サーモグラムの変化から，前転移は $X_{ch} \geq 0.08$ で消失し，また主転移は $X_{ch} \geq 0.35$ で消失することがわかる。二分子膜全体が L_o 相の状態になると，リン脂質分子の炭化水素鎖の融解がほぼ完全に抑制されることから，C16PC–コレステロール二成分二分子膜では，$X_{ch} \geq 0.35$ で膜全体が L_o 相の状態になると考えられる。鎖長の異なるその他の C*n*PC–コレステロール二成分二分子膜（n = 14, 15, 17, 18）に対しても，特徴的な X_{ch} に多少の違いが見られたものの，ほぼ類似の変化が観測された。

Fig.2(b)と **2(c)**には，それぞれ，鎖長の異なる５種類の C*n*PC のコレステロール含有二成分二分子膜に対する DSC 測定から得られた主転移エンタルピーΔH_m および主転移の吸熱ピークの半値幅$\Delta T_{1/2}$ の X_{ch} 依存性を示している。C18PC 系を除くその他４種類の C*n*PC 系（n = 14–17）では，炭化水素鎖長 n によらず，X_{ch} の増加に伴いΔH_m は概ね直線的に減少し，直線外挿から X_{ch} = 0.33 近傍で 0 になることがわかる。C18PC 系では，同様にΔH_m はほぼ直線的に減少するもののその勾配の大きさは小さく，直線外挿から X_{ch} = 0.50 近傍で 0 になることがわかる。コレステロールが膜内に取り込まれると，その周囲のリン脂質分子の炭化水素鎖の融解を抑制する。したがって，X_{ch} の増加に伴うΔH_m の減少は膜内のコレステロール組成の増加に伴い，炭化水素鎖の融解を引き起こすリン脂質分子の割合が減少することに起因する。そして C18PC 系では X_{ch} = 0.50 以上で，その他４種類の C*n*PC 系（n = 14–17）では X_{ch} = 0.33 以上で膜内にほぼ完全に L_o 相が形成され，ΔH_m が 0 になると考えられる。またさらに，ΔH_m の減少がほぼ直線的であったことから，コレステロールは膜中でほとんど局在していないことが示唆される。

一方$\Delta T_{1/2}$ に関しては，**Fig.2(c)**からわかるように，炭化水素鎖長に依らず，共通して X_{ch} = 0.15 付近を境にして，その X_{ch} 依存性が劇的に変化する。$X_{ch} \leq 0.15$ では，$\Delta T_{1/2}$ 値は概ね 1 °C 以下であるのに対して，$X_{ch} \geq 0.15$ では，X_{ch} の増加に伴い急激に増加する。一般に，$\Delta T_{1/2}$ 値は転移の協同性に反比例することが知られている。[15]このことを考慮すれば，X_{ch} = 0.15 付近を境にして，C*n*PC 分子の炭化水素鎖の融解の協同性を著しく低下させるような何らかの大きな変化が二成分二分子膜内に生じていると考えられる。次節で相図をもとに説明するが，これはこの組成以上で，二相共存のうちの一つの相として L_o 相が現れ始めることがその一因であろう。

Fig.3 には，X_{ch} の異なる一連の C16PC–コレステロール二成分二分子膜に対する Prodan 蛍光スペクトル測定から得られたλ_{max} の温度依存性を示す。コレステロールを含まないとき，昇温に伴い約 34 °C でλ_{max} 値が 440 nm 付近からわずかに高波長側へとシフトし，さらに約 42 °C で 490 nm 付近まで急激にシフトした。これらのλ_{max} のシフトは，それぞれ C16PC 二分子膜の前転移および主転移に起因し，その温度は上述の DSC 測定の結果とよく一致する。すなわち，このことは λ_{max} の温度依存性曲線から二分子膜相転移の温度を決めることが可能であることを意味する。X_{ch} = 0.05 では，前転移に対応した高波長側へのわずかなλ_{max} のシフトが明確には見られないことから，この組成で前転移が消失したことが示唆される。この前転移消失の X_{ch} 値は DSC の結果に比べやや低い。もともと前転移に伴うλ_{max} の変化は小さいことを考慮すれば，DSC のほうが前転移の検出に関しては精度がよいのかも知れない。さらに X_{ch} が増加すると，主転移に対応した λ_{max} の 490 nm 付近へのシフトにも明確な変化が見られるようになる。つまり，λ_{max} のシフトが X_{ch} の増加と共に緩やかになり，結果的に λ_{max} が 490 nm に到達する温度が徐々に高温側へと移行する。このことは，膜内に存在するコレステロールの割合が増加するにつれて，主転移が，ある温度で起こる不連続な変化（つまり相転移）から，有限の温度域で連続的に進行する「過程」へと変化したことを示唆する。この点を考慮し，我々は λ_{max} のシフトが開始・終了する両温度を，主転移を特徴付ける温度として相図にプロットした。なお，DSC 測定で見られた主転移の吸熱ピークの温度は，λ_{max} のシフトの開始温度によく一致する。

4. C*n*PC–コレステロール二分子膜の相図

DSC 測定ならびに Prodan 蛍光スペクトル測定から得られた結果をもとに構築した，一連の C*n*PC–コレステロール二成分二分子膜に対する温度–組成相図を **Fig.4(a)–(e)**に示す。相図の全体的な特徴として，相境界線の形状が **Fig.1(d)** に示した非調和融解を示す二成分混合物の固液相図に類似していることが挙げられる。一連のコレステロール含有二成分 C*n*PC 二分子膜の相挙動に関して，この類似性をもとに幾つかの重要な特徴を推定することができる。

第一の特徴として，一般的な二成分混合物の固体状態に相当するリン脂質二分子膜のゲル状態（あるいは S_o 相）において，C*n*PC 分子とコレステロールは本質的に非混和であることが推察される。ただし理想的な二成分混合物のような完全な非混和ではない。C14PC，C15PC および C16PC 系では，高コレステロール組成域で主転移開始温度が X_{ch} の増加と共に上昇する傾向がみられ，この温度上昇は相図上では固相線に対応するものと考えられる。対応する固溶度線（図中点線）は実験的に決定することができなかったが，すでに述べたとおり，固相線および固溶度線の存在は固体状態での部分的な溶解を意味する。したがって，これら３種類の C*n*PC 分子に関しては，膜内でコレステロールと完全非混和ではないと考えられる。さらに C*n*PC 分子の炭化水素鎖長が長くなるにつれて，固相線の湾曲が小さくなり，C17PC および C18PC 系では固相線が相図上に現れなくなることから，炭化水素鎖の伸張に伴ってコレステロールとの混和性が低くなる傾向があることが推察される。

第二に，いずれの C*n*PC–コレステロール二成分二分子膜に対しても，相図上で非調和融点（**Fig.1(d)**の点 P）に似た特徴的な点が，共通して X_{ch} = 0.15 付近に確認されることから，ゲル状態においてコレステロールと複数の C*n*PC 分子からなるクラスターが形成されている可能性が示唆される。 クラスターの組成比はその X_{ch} 値から 1 : 6（コレステ

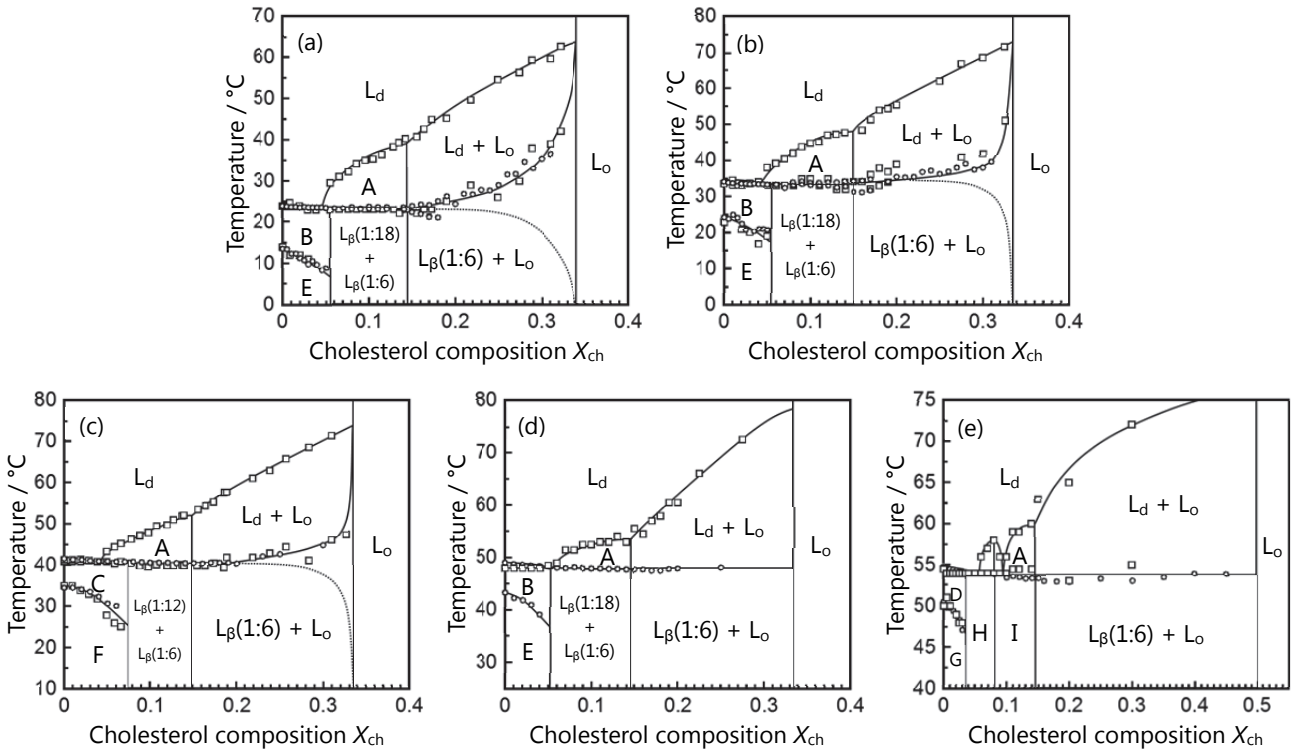


Fig. 4 Temperature–cholesterol composition (X_{ch}) phase diagrams of CnPC–cholesterol binary bilayers: (a) C14PC, (b) C15PC, (c) C16PC, (d) C17PC, (e) C18PC. Open circles and open squares represent the data from DSC and Prodan fluorescence spectroscopic measurements, respectively. The areas indicated by alphabets A–I correspond to the following phases: (A) L_d + $L_\beta(1:6)$, (B) L_β' + $L_\beta(1:18)$, (C) L_β' + $L_\beta(1:12)$, (D) L_β' + $L_\beta(1:30)$, (E) P_β' + $L_\beta(1:18)$, (F) P_β' + $L_\beta(1:12)$, (G) P_β' + $L_\beta(1:30)$, (H) $L_\beta(1:30)$ + $L_\beta(1:12)$, (I) $L_\beta(1:12)$ + $L_\beta(1:6)$.

ロール:C*n*PC）と推定できる。クラスター形成を想定することで，DSC 測定から明らかとなった，$X_{ch} \geq 0.15$ における $\Delta T_{1/2}$ の急激な増加，すなわち相転移の協同性の著しい低下についても合理的に説明できる。非調和融点の別称である包晶点という名称は，二成分系の片方の成分の結晶の周りにそれを包み込むように残りの成分の結晶が形成されることに由来する。つまり，クラスター形成に伴い膜内での側方組織化状態の秩序性が低下し，その融解・凝固過程が複雑化するため相転移の協同性が低くなったと考えられる。

第三の特徴として，前転移および主転移の消失について説明しておこう。相図上では，それぞれの転移が消失する X_{ch} 値に等組成線が引かれている。すでに述べたとおり，主転移の消失は膜全体が L_o 相の状態になることに起因する。C18PC–コレステロール二成分二分子膜のみ主転移消失の X_{ch} 値が高いのは，次節で詳述するように，二分子膜の疎水性領域の厚さと膜中に取り込まれたときのコレステロール分子の疎水部分のミスマッチ（疎水性不一致）に起因すると考えられる。[16]一方，前転移の消失は二分子膜中での C*n*PC 分子の傾斜配向の解消に起因すると考えられる。[17] つまり，C*n*PC 分子は嵩高いコリン基を極性頭部基にもつため，ゲル状態の二分子膜中において二分子膜垂線に対して約 30°傾斜して配向しているが，コレステロールが取り込まれるとその周囲の C*n*PC 分子に垂直配向が誘起され，最終的に膜中全ての C*n*PC 分子が垂直に配向した時点で前転移が消失するということである。相図からわかるように，前転移の消失する X_{ch} 値は C*n*PC 分子の炭化水素鎖長により異なる。このことは，垂直配向を誘起するというコレステロール効果の伝播する範囲が，二分子膜を形成しているリン脂質分子の炭化水素鎖長によって変化することを意味している。

これらの特徴的なコレステロール組成を含め，一連の X_{ch} に依存した二成分二分子膜相状態の変化は，Somerharju らの提唱する超格子モデル[18]を適用することでうまく説明できる。彼らのモデルによると，コレステロールは膜中で規則的に分布する傾向があり，その分布は六方格子を用いてうまく表すことができる。**Fig.5** には，一連の特徴的な X_{ch} 値に対応した膜中でのコレステロールの規則的な分布を模式的に示している。**Fig.5(a)–(c)**に示した模式図は，前転移消失の X_{ch} 値に対応する規則分布を表す。例えば **Fig.5(c)**は，C16PC–コレステロール二成分二分子膜の前転移消失の組成，$X_{ch} = 0.08$，に対応した規則分布の模式図である。この図から，上述の垂直配向を誘起するというコレステロール効果が，平均的にコレステロール分子の周囲 12 個の C16PC 分子に及ぶと推定される。**Fig.5(d)**は，特徴的な組成の一つである $X_{ch} = 0.15$ における 1:6-クラスターの形成に対応する。すでに述べたとおり，1:6-クラスターの形成は，リン脂質分子の炭化水素鎖長に依存せず，全ての C*n*PC 系に共通の特徴である。**Fig.5(e)**と **5(f)**は，主転移消失の組成に対応するコレステロールの分布を表した模式図であり，前者が n = 14–17 のときの，後者が n = 18 のときの C*n*PC–コレステロール二成分二分子膜の主転移消失の組成に対応する。この模式図から，L_o 相の状態は，コレステロール:C*n*PC が 1:2（n = 14–17）または 1:1（n = 18）の状態に対応すると推定され，この状態よりも膜中のコレステロールの割合が増加すると，膜中全ての C*n*PC 分子の炭化水素鎖の融解が抑制されると考えられる。

最後に，相図の各領域に対する相の割当てについて説明しておく。基本的には，一般的な非調和融解型の二成分混合物の固液相図（**Fig.1(d)**）をもとに，相を割当てている。

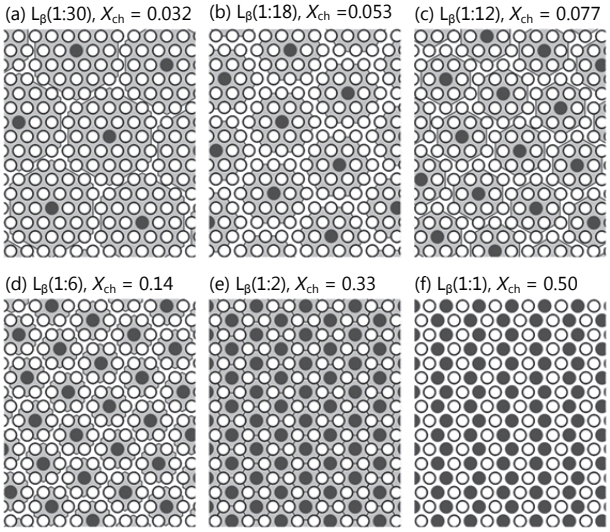


Fig. 5　Schematic illustration for various types of regular distribution of cholesterol within binary bilayers based on the hexagonal lattice model.　A closed circle and an open circle represent a cholesterol and a C*n*PC molecule, respectively. Each fundamental unit is indicated as a dark shaded area around each cholesterol molecule.

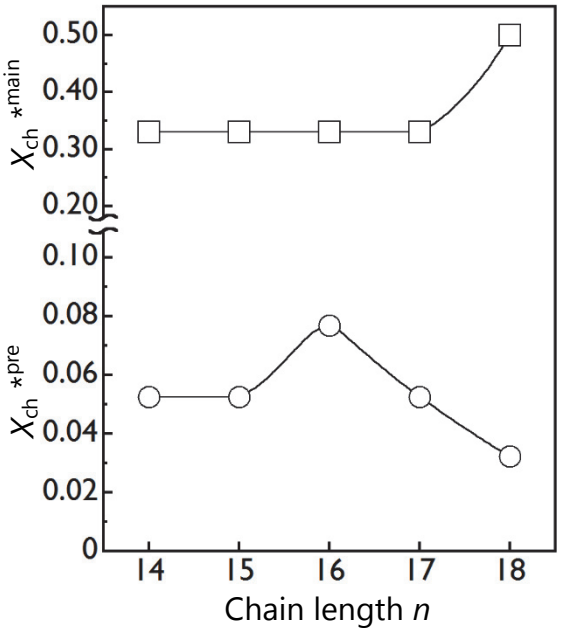


Fig. 6　Hydrocarbon-chain length (*n*) dependence of the cholesterol compositions at which the pretransition (○) and the main transition (□) are abolished.

図中に書かれた相の略称，L_β(1:30)，L_β(1:18)，L_β(1:12)および L_β(1:6)は，それぞれ **Fig.5(a)**から **5(d)**に示された模式図の状態に対応し，膜内での分子の配向としてはいずれも垂直配向した L_βの状態であるが，コレステロールとの相互作用という点で熱力学的に区別される相である。上述した特徴的な組成以外の中間的な組成では，その両端の特徴的な組成に対応した二つの相の共存状態にあり，図中「+」で表している。例えば C16PC–コレステロール二成分二分子膜の X_{ch} = 0.12 の場合，主転移（開始）温度以下では，特徴的な組成 X_{ch} = 0.08（L_β(1:12)相，**Fig.5(c)**）と X_{ch} = 0.15（L_β(1:6)相，**Fig.5(d)**）との間に相当するので，その相状態は L_β(1:12)相と L_β(1:6)相との二相共存（L_β(1:12) + L_β(1:6)）に対応する。

5. コレステロール効果の炭化水素鎖長依存性

主転移および前転移が消失するコレステロール組成（X_{ch}*^{main} および X_{ch}*^{pre}）の炭化水素鎖長依存性を **Fig.6** に示す。X_{ch}*^{main} については，すでに述べたように，C18PC–コレステロール二成分二分子膜に対してのみ 0.50 で，それ以外の二成分二分子膜では 0.33 であり，これは疎水性不一致に起因すると考えられる。疎水性不一致は n = 17 のとき最小になることが知られており，[19]したがって C18PC の場合，二分子膜の疎水鎖領域の厚さの方がコレステロール分子の疎水部分よりも長いため，コレステロールが膜中に取り込まれると二分子膜の中央部分に空隙が生じ得る。[16]このような空隙はエネルギー的に不利なため，それを最小限にしようと，リン脂質の炭化水素鎖の末端部分が折れ曲がり構造をとる傾向が強くなり，リン脂質分子の炭化水素鎖の完全な融解抑制が困難になるため，結果として，L_o 相形成には，より多くのコレステロールが必要となると考えられる。逆に，二分子膜の疎水鎖領域の厚さのほうが短い（n ≤ 17）場合，コレステロール周辺の C*n*PC 分子は，疎水性不一致を最小限にするため，炭化水素鎖は伸びきった状態を取らざるを得ない。そのため，より少ないコレステロール量で膜内全ての C*n*PC 分子の炭化水素鎖の融解が抑制されると考えられる。

一方，X_{ch}*^{pre} の挙動は，X_{ch}*^{main} よりも複雑である。X_{ch}*^{pre} は n = 16 のとき最大になることから，X_{ch}*^{pre} の炭化水素鎖長依存性には相反する二つの因子が含まれていることが示唆される。前転移の消失は垂直配向の誘起に起因することを考慮すれば，一つは，炭化水素鎖が長くなれば，より多くの C*n*PC 分子に垂直配向が誘起されるような因子であり，もう一つは逆に，炭化水素鎖が短くなるとともに垂直配向の誘起が促進される因子である。前者は，おそらく van der Waals 力であろう。つまり，炭化水素鎖長が長くなるにつれ，炭化水素鎖間に働く van der Waals 力が強くなるため，コレステロール分子による垂直配向誘起の効果が膜内でより遠くまで伝播すると考えられる。一方，後者に関してはまだ不明な点も多いが，筆者らは次のように考えている。疎水性不一致を考慮すると，炭化水素鎖長が短くなるにつれて，コレステロール分子は徐々に二分子膜内の親水領域部分に突出せざるを得なくなると考えられる。その結果，垂直配向した C*n*PC 分子の極性基頭部間に働く静電的な斥力が弱められ，垂直配向誘起の効果がやはりより遠くまで伝播するようになると考えている。最近の MD シミュレーションによると，[20]膜内でのコレステロール分子の傾斜がコレステロール効果の発現に影響すると報告されていることを考えると，X_{ch}*^{pre} の炭化水素鎖長依存性にみられた二相性を明らかにするためには更なる研究が必要である。

6. おわりに

本稿では，DSC 測定および Prodan 蛍光スペクトル測定により構築した温度－組成相図に基づき，鎖長の異なる 5 種類の C*n*PC 二分子膜（n = 14–18）の相挙動におよぼすコレステロール効果について解説した。全体的な特徴として，これらの二成分二分子膜の相図は，非調和融解を示す二成分混合物の固液相図と類似していることから，膜内において本質的にコレステロールと C*n*PC 分子は非混和であることが示唆された。さらに，超格子モデルを適用することにより，コレステロールが誘起する側方相分離挙動をうまく説明できるだけでなく，二分子膜を形成しているリン脂質分子の炭化水素鎖長とコレステロール効果との関係性をよ

り定量的に考察することができた。

現在我々は，リン脂質分子のグリセロール骨格と炭化水素鎖間の結合様式とコレステロール効果との関連性について系統的に研究を進めている。これにより，コレステロールとリン脂質分子間の相互作用の違いが膜内混和性や側方相分離挙動におよぼす影響をより明確化できると同時に，実際の細胞膜におけるラフト形成に対する熱力学的理解をさらに深められると期待している。

文　献

1) K. Simons and E. Ikonen, *Nature* **387**, 569-572 (1997).
2) R. A. Demel and B. de Kruyff, *Biochim. Biophys Acta* **457**, 109-132 (1976).
3) P. L. Yeagle, *Biochim. Biophys. Acta* **822**, 267-287 (1985).
4) D. J. Recktenwald and H. M. McConnell, *Biochemistry* **20**, 4505-4510 (1981).
5) J. H. Ipsen, G. Karlström, O. G. Mouritsen, H. Wennerstöm, and M. J. Zuckermann, *Biochim. Biophys. Acta* **905**, 162-172 (1987).
6) M. R. Vist and J. H. Davis, *Biochemistry* **29**, 451-464 (1990).
7) D. Marsh, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, 688-699 (2010).
8) N. Tamai, M. Uemura, T. Takeichi, M. Goto, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Biophys. Chem.* **135**, 95-101 (2008).
9) N. Tamai, M. Uemura, M. Goto, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Colloids Surf. B: Biointerf.* **65**, 213-219 (2008).
10) N. Tamai, T. Izumikawa, S. Fukui, M. Uemura, M. Goto, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 2513-2523 (2013).
11) G. Weber and F. J. Farris, *Biochemistry* **18**, 3075-3078 (1979).
12) M. Kusube, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Colloids Surf. B: Biointerf.* **42**, 79-88 (2005).
13) M. Kusube, N. Tamai, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Biophys. Chem.* **117**, 199-206 (2005).
14) E. K. Krasnowska, L. A. Bagatolli, E. Gratton, and T. Parasassi, *Biochim. Biophys. Acta* **1511**, 330-340 (2001).
15) R. N. A. H. Lewis and R. N. McElhaney, “The structure of biological membranes 2nd Ed.” (Chap.2), ed. P. L. Yeagle, CRC Press.
16) T.-H. Huang, C. W. B. Lee, S. K. Das Gupta, A. Blume, and R. G. Griffin, *Biochemistry* **32**, 13277-13287 (1993).
17) T. P. W. McMullen, R. N. A. H. Lewis, and R. N. McElhaney, *Biochemistry* **32**, 516-522 (1993).
18) P. Somerharju, J. A. Virtanen, and K. H. Cheng, *Biochim. Biophys. Acta* **1440**, 32-48 (1999).
19) T. J. McIntosh, *Biochim. Biohys. Acta* **513**, 43-58 (1978).
20) G. Khelashvili, G. Pabst, and D. Harries, *J. Phys. Chem. B* **114**, 7524-7534 (2010).