

リン脂質二重層内の疎水性水和水と Ca^{2+} の作用

滝沢 俊治

(平成元年6月14日受理)

Hydrophobic Hydration within Phospholipid Bilayers
and the Dehydration Effect of Ca^{2+} Ions

Toshiharu Takizawa

Some recent topics concerning to the structure and properties of lipid bilayers are reviewed with the special reference to hydrophobic hydration. The partial molar heat capacity per CH_2 group in the aqueous dispersions of phospholipids is much larger than the heat capacity per CH_2 group in solid paraffins. The reason for the large heat capacity is well interpreted by hydrophobic hydration of CH_2 groups within the phospholipid bilayers. The mixing enthalpies of the aqueous dispersions of triphosphoinositide (TPI) and the aqueous CaCl_2 solution are positive, while those of glycerylphosphoryl-inositoldiphosphate (GPI DP, the hydrophilic part in TPI) are negative at lower concentrations of CaCl_2 . The positive contribution of the hydrocarbon chains in TPI to the mixing enthalpy is attributed to the dehydration of lipid bilayers induced by Ca^{2+} ions. The water adsorption experiment shows that the amount of hydrophobic hydration of the unsaturated acyl chains in the lipid bilayers is much higher than that of the saturated chains.

1. はじめに

生物の基本単位としての細胞は、流動性を持った細胞質と、それを覆って内側に閉じ込めている細胞膜より成り立っている。細胞膜があることによって、細胞内の物質系は外界から独立して、独自の自率的な化学反応の連鎖一すなわち生命活動を展開することができる。しかしながら一方で細胞は、外界との物質のやりとりなしにはその生命体としての機能を永続させることができない。そしてこの物質のやりとりはすべて細胞膜を介して行なわれる。細胞膜は生物らしい合目的な機能を具えた膜であり、ATPの化学エネルギーを用いて、濃度勾配に逆らう物質の輸送を行なうこともできる¹⁾。

生体膜の構造モデルとして有名なのは、SingerとNicolson

によって提出された流動モザイクモデルである。それによればタンパク質分子は、流動性のある脂質二重層内に埋め込まれて、自由に動き回ることができる²⁾。この膜モデルにおける脂質の基本的役割は、流動性をもった二次元の膜構造を作ることである。このモデルに立脚して生体膜の輸送機能を理解しようとする研究者の主な関心は膜タンパク質に向けられ、脂質二重層はあまり注目されて来なかった。しかし、リン脂質のみで構成される人工膜でも、自励発振が観測されたり³⁻⁴⁾、嗅い物質に対する脱分極現象が報告されていることなどからみても⁵⁻⁶⁾、物質の透過性という観点から脂質二重層を見直すことが必要であろう。特に、水やプロトンまたはヒドロキシイオンの脂質二重層に対する透過能は、予想外に高いことから考えると⁷⁻⁸⁾、脂質二重層はその内部にかなり多量の水を取り込んでいる可能性がある。SingerとNicolsonの膜モデルにより、リン脂質膜内部は高度に疎水的であると通常考えられているため、このような観点に立った膜物性の研究はこれまであまり行なわれて来なかった。

本稿ではホスファチジルコリンの部分分子熱容量、および水溶性複合脂質であるトリホスホイノシチドの熱的

群馬大学教養部物理教室：群馬県前橋市荒牧町4-2

〒371

Department of Physics Faculty of General Studies, Gunma University, Aramaki-cho, Maebashi 371, Japan

研究を中心に、脂質二重層内部に存在する水の問題に焦点を当てて、研究の現状を紹介する。

2. リン脂質—水系の熱容量

リン脂質はゲル—液晶転移にともなう、明瞭な吸熱性の熱的变化を示すので、走査熱量測定によってリン脂質—水系の相転移を研究した報告は数多い。しかしながら、リン脂質分散系の熱容量の精密測定の結果に基づいて、その部分分子熱容量の絶対値について考察した研究は少ない。

WilkinsonとNagleはマイクロカル社のMC-1型走査熱量計を用いて、リン脂質濃度16–36 mg/ml、走査速度12.3 K/hで溶液の熱容量を測定し、水に分散したリン脂質の部分分子熱容量の正確な値を始めて報告した⁹⁾。彼らは、リン脂質の部分分子熱容量はバラフィン炭化水素に比べてかなり大きく、またゲル状態での温度依存性も著しく高いことを見出し、膜内で周囲の分子から束縛を受けた炭化水素鎖の振動が、温度上昇によって徐々に解放されることに、それらの原因を求めた。

その後Blumeは、Wilkinsonらの得たこの異状に大きい分子熱容量値に注目し、いわゆる疎水性水和の寄与があるかどうかを検討するために、異なる炭化水素鎖をもつリン脂質の部分分子熱容量を系統的に測定した¹⁰⁾。彼は、生体高分子の希薄溶液の熱測定分野で高い評価を得ているPrivalovのDASM-1型示差走査熱量計を用い¹¹⁾、昇温速度1 K/minで測定を行った。用いた溶液の脂質濃度はWilkinsonらのものよりも1桁以上希薄な1 mg/mlであり、脂質としてはホスファチジルコリン(PC_s)、ホスチジルエタノールアミン(PE_s)、ホスファチジン酸(PA_s)の種々の鎖長のものが用意された。

見かけの部分分子熱容量は次式から決定される。

$$^{\phi}C_p = (C_{p,w} \frac{V_L}{V_w} - \frac{\Delta}{m_L}) M_L$$

ここで、 M_L はリン脂質の分子量、 $C_{p,w}$ は水の比熱容量、 V_L と V_w はそれぞれリン脂質および水の比容、 m_L は試料容器内の脂質の質量、 Δ は、両試料容器に水を入れたときの基線と片側の試料容器には試料溶液を入れたときの基線との間の、ずれの大きさを表わす。この基線のずれの大きさ・ Δ は、同一条件の試料溶液でも試料のつめかえのたびにその値にばらつきを生じ、 $^{\phi}C_p$ に及ぼす誤差としてはこれが最も大きい。すべての誤差を含めた測定の相対誤差は5–10%程度であった。

炭化水素鎖の長さをパラメータとして20°Cでの部分分子熱容量をプロットすると直線関係が得られ、それより1メチレン基当りの $^{\phi}C_p$ の平均増加率について次表の結果が得られた。

Table 1 Average increase in $^{\phi}C_p$ per additional methylene group, $\Delta^{\phi}C_p$ (cal·K⁻¹·mol⁻¹) for PC and PE at 20°C (in the gel phase) and at 80°C (in the liquid crystalline phase), in comparison with solid and liquid n-alkanes. (A. Blume, *Biochemistry* 22, 5438 (1983))

Lipid	T=20 °C	T=80 °C
PC	13.0	16.5
PE	10.5	7.5
n-alkanes	4.5*	7.8*
Hydrophobic hydration	21.5**	

* Data from Messerly *et al.*

** Data from Roux *et al.*

Blumeは溶液の部分分子熱容量に寄与する要因を、リン脂質に固有なものと構造に起因するものとに分類して、メチレン基1個当りの部分分子熱容量の増加率を議論している。まず固有のものとしては、分子の振動、長軸のまわりの回転、並進運動、さらに熱膨張時の仕事等があり、構造によるものとしては、脂質分子とそれを取り囲む水との相互作用に起因する部分分子熱容量の変化がある。後者のうち、疎水性基と水との相互作用は、大きなエントロピーの減少と部分分子熱容量の増大をもたらす¹²⁾。

ところで、各種の親水基とアルキル鎖とをもつ有機化合物について、無限希釈での部分分子熱容量 $^{\phi}C_p$ の測定がなされた結果、メチレン基1個当りの $^{\phi}C_p$ の増加は21.5 cal·K⁻¹·mol⁻¹程度であることがわかっており^{13–17)}、また、*n*-アルカンの固体および液体の分子熱容量の増加はそれぞれ、4.5および7.8 cal·K⁻¹·mol⁻¹であることが知られている¹⁸⁾。表からわかる通りPCおよびPEのメチレン基1個当りの $^{\phi}C_p$ の増加率は、*n*-アルカンの場合のその増加率と、完全な疎水性水和が起っていると考えられる無限希釈でのその増加率との間にあり、そのことは、水に分散したホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンでは、それらのアルキル鎖に部分的な疎水性水和が生じることを示しているものと解釈される。

疎水性の長鎖をもつ両親媒性物質のリン脂質は、水中ではその炭化水素鎖を水から遠ざけ、表面に親水性部分を露出させて安定な膜構造をとる。そのため膜の内部は高度に疎水的であると考えられている。SingerとNicolsonの流動モザイクモデルでもリン脂質の二分子膜はそのようなものとして取り扱われている。したがって、膜

内部の疎水的部分への水の浸透を仮定することには、かなりの反論があり得よう。

しかしながら、膜内部への水の浸透については、それを支持する他のいくつかの事実もある。まず、はじめに述べたように、リン脂質膜は水や H^+ または OH^- に対して予想外に高い透過能を与えることがあげられる。Deamer らは、水素結合して連なった水の鎖が、疎水性の膜を貫いて存在するために、リン脂質膜は H^+ または OH^- に対して高い移動度を与えていると考えている²¹⁾。

また、Griffith らは ESR 法により、スピンラベルしたリン脂質を用いて、リン脂質膜のどの部分まで水が入り込んでいるか調べた結果、表面から 1/3 の深さまで水が入っていると結論した¹⁹⁾。Simon らは、完全に水化した多重層膜を用いて、X線回折法により推定した膜の厚さ(膜の両面の親水基間距離) d_b と、誘電率測定により推定した低誘電率領域の厚さ d_e とから、膜への水の浸透の深さ(膜表面から連続して入り込んでいる水層の厚さ)を与えるパラメータとして、

$$d_w = (d_b - d_e)$$

をとり、水の膜への浸透を議論している²⁰⁾。それによれば、バクテリアから抽出されたホスファチジルエタノールアミンの場合には、 $d_w \cong 5.5 \text{ \AA}$ 、これにコレステロールが 1 : 1 の割合で混合している膜では、 $d_w \cong 3 \text{ \AA}$ であった。コレステロールが入った場合に d_w が減少するという結果は、コレステロールの効果に関する別の報告とも矛盾しない。なお $5.5 \text{ \AA}$ という値は膜面からみてより深い位置にある 1 位のカルボニル基の位置に相当する。また Ashcroft らによれば、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) のばあい水は両アシル基の第 2 のメチレン基まで入り込んでいる²¹⁾。

膜内部への水の浸透の程度を推定するためには、H と D に対する中性子の散乱能の差を利用した、中性子線構造解析が有力である。DPPC-水系の中性子線構造解析を行った Büldt や Zaccai らによって、DPPC では少なくとも 2 個のカルボニル基まで、水が入り込んでいることが報告されている²²⁻²³⁾。DPPC のばあい、グリセロールの 2 位に結合しているアシル基がとっている、折れ曲ったコンフォメーションを考慮するならば、カルボニル基から数えて少なくとも 3 つめの CH_2 基は、水と接触しているであろうと Blume は考えている。

3. リン脂質分散系への Ca^{2+} の結合熱²⁴⁾

従来、生体膜脂質の構造と物性に関する多くの研究は、生体膜に最も多く含まれているホスファチジルコリン (PC) やホスファチジルエタノールアミン (PE) を用いて行なわれて来た。しかし生体膜には、細胞の種類ごと

に異なる一定の割合で、それ以外のリン脂質や糖脂質が含まれ、細胞膜の機能の発現により直接的な形で関わっていることが知られている²⁵⁾。われわれは、そのようなリン脂質の中でも特にその機能的役割が注目されているトリホスホイノシチド (TPI, 1-(3-*sn*-phosphatidyl)-*L*-*myo*-3,4-bis (phosphate)) について種々の物性的研究を進めて来た。

TPI の存在比は脳や腎臓の細胞膜が高く、また種々の細胞膜中の存在比は膜の ATP アーゼの存在量と強く関係している。これらのことからみて TPI は膜の水やイオンの透過性に関わっている脂質であることが予想される^{25, 26)}。TPI はイノシトール-3-リン酸を親水基として持った、図 1 のような化学構造の酸性リン脂質であり、その発見は比較的新らしい。TPI 分子の発見のすぐあとに行なわれた、その膜内における機能的役割についての研究の結果、TPI は神経膜の興奮時に、膜の水やイオンの透過能を増大させるのに関与しているリン脂質であろうと推定された^{27, 28)}。

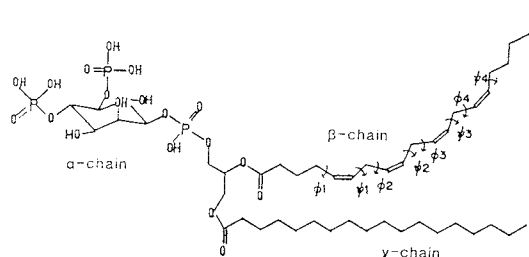


Fig. 1 Molecular structure of TPI

ところで、神経細胞の軸索を伝わる電気的パルスの発生機構の説明としては、Hodgkin-Huxley の Na 説が有名である²⁹⁾。この理論は、神経膜には Na^+ イオンを選択的に通すチャンネルと、 K^+ イオンを選択的に通すチャンネルが存在し、それら 2 つのチャンネルの開閉が時間差をもって起こることによって電気的パルスが発生すると仮定する。一方田崎は、神経膜の興奮現象には、細胞外液に適当な濃度の Ca^{2+} イオンが存在する必要があることを実験的に示し、 Ca^{2+} イオンの役割を重視する、神経膜の興奮機構を提唱した^{30, 31)}。田崎説によれば、興奮性膜は静止状態と興奮状態の 2 状態をとり、一方から他方への変化は不連続的に起り、かつその変化は Ca^{2+} の膜への結合と、逆に膜からの離脱によってひき起される。即ち、膜に Ca^{2+} が結合した状態では、膜は 1 価イオンに対する絶縁体であるが、 Ca^{2+} がはずれた状態では導体となる。

神経膜に対する Ca^{2+} のこの作用仮説からみて、TPI

に対する Ca^{2+} の次のような作用が注目される。即ち、TPI の 1 価カチオン塩は水溶性であるため、クロロホルム：メタノール 2 対 1 の混合溶媒に 0.2 溶の水を加えてできる 2 相溶媒系にそれを入れるとき、すべて上層液 (C : M : H_2O = 3 : 47 : 48) に溶ける。しかし、そこに Ca^{2+} を加えると、TPI は非常に疎水的になり、すべての TPI が Ca 塩として、クロロホルムが主成分である疎水的環境の下層に移行する。すべての生体膜脂質のうちで TPI だけがこのような特性を示す²⁵⁾。

神経膜の興奮現象に関する Ca^{2+} 説は、 Ca^{2+} が膜に付くことによって、それまで親水的だった膜が疎水的になり、それに付随して、1 価塩の膜透過能も失なわれることを想定している。したがってまさに TPI は、 Ca^{2+} 説が興奮性膜のもつべき機能として要求する、物性的な特性をもっている。このような観点に立てられれば、TPI に対する Ca^{2+} の作用を、混合熱測定によって研究することを試みた。

測定に用いた熱量計は、応用電機製 CM-204 型微小熱量計 (改良型) 及び東京理工 MPC-111 型マルチバースカロリメータ (回転ブロック付属) であり、両熱量計の熱流量検出には、71 対の p-n 対半導体素子から成る、Melcor 社製のサーモモジュールが用いられている。液-液混合のための試料セルとしては、CM-204 の場合、内部に隔壁のついた円筒型のガラス製試料容器を用いている。混合する 2 液を、この容器のそれぞれの仕切に入れ、熱的平衡に達するのを待って、ガラス容器の回転により 2 液を混合する。混合熱は、流動パラフィンを通して、銅製の底部に取り付けられたサーモモジュールに伝達する仕組みになっている。MPC-111 の回転ブロックの場合には、やはり隔壁のついた円筒型の金属試料容器に 2 液を入れ、回転ブロック全体を回転させて混合を行なう。混合熱測定は、通常、各 2 ml のリン脂質分散液と CaCl_2 水溶液を用いて、21.5 °C で行なわれた。

TPI は、牛脳より Folch のセファリン分画法で (Tri-, Di-, Mono-) ホスファチジルイノシトール (TPI, DPI, MPI) とホスファチジルセリン (PS) の混合物を抽出したのち、DEA セルロースカラムで分画したものをを用いた^{32,33)}。PS は酸化アルミナカラムで分画することによって得た。また、TPI および PS を Hawthorne の方法でアルカリ処理することにより³⁴⁾、それぞれのアシル基をはずした親水基のグリセリール・ホスホリール・イノシトール・ジホスフェイト (GPIDP) およびグリセリール・ホスホリール・セリン (GPS) も用いた。

図 2 は水に分散した TPI- NH_4 と CaCl_2 水溶液との混合熱、および GPIDP- NH_4 のそれを、それぞれ CaCl_2 の初期濃度に対してプロットしたものである。TPI の

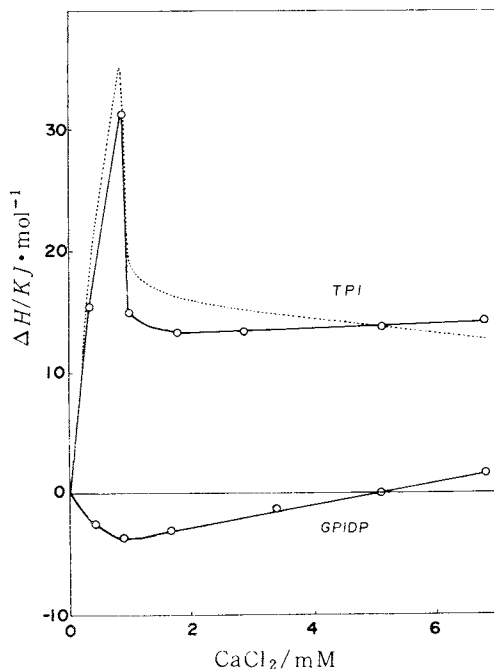


Fig. 2 Mixing enthalpies of the aqueous dispersions of TPI and GPIDP (a head group of TPI) solution with CaCl_2 solutions. A dotted line represents $\Delta H_{\text{TPI-Ca}} - \Delta H_{\text{GPIDP-Ca}}$.

場合、この反応は吸熱であるが、 CaCl_2 濃度が 1 mM 以下のところに、混合エンタルピーの極大がある。そのことは、この反応が吸熱から発熱に転ずる 2 相性のものであることを示唆していると考えられる。一方、GPIDP の場合には、 CaCl_2 濃度の低い領域では小さな発熱反応であるが、 CaCl_2 濃度の増加につれてその値は徐々に減少し、やがて小さな吸熱性の反応に転ずる。

さて、水中における TPI- NH_4 と CaCl_2 との反応熱が、単純に考えて、親水性の GPIDP 部分からの寄与と、アシル基部分からの寄与の和であるとして、アシル基の寄与を見積った結果は図中に点線で示されている。図にみられるように、混合のエンタルピーに対するアシル基の寄与は正となり、その絶対値は GPIDP のそれよりも大きい。アシル基と CaCl_2 の直接的な作用によっては、このように大きな熱の吸収は起り得ない。したがって、溶媒としての水の状態が変化することによって、大きな正のエンタルピー変化が生ずるものと考えなければならない。

もしも、TPI の親水部位への Ca^{2+} の結合がひきかねとなって、隣接アシル基間の疎水的相互作用が強められ、その結果として、それまでアシル基に疎水的に水和して

いた水が放出されるとすれば、その過程でアシル基は正のエンタルピー寄与をすることになる。

比較のために、同じ酸性のリン脂質に属する PS、およびその親水性部位の GPS についても同様の測定がなされた(図3)。この場合には、全 CaCl_2 濃度にわたって混合エンタルピーは負であり、かつアシル基の寄与も負である。

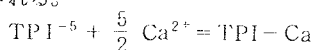
ここで、混合熱に及ぼすアシル基の効果が、TPI の場合には正であり、PS の場合には負であることをどう解釈したら良いだろうか。

しかし、この疑問に答える前に、この違いの中には、見かけのものも含まれていることを注意する必要がある。即ち、さきにみたように TPI では反応が 2 相性であり、低濃度では吸熱、高濃度では発熱であるとすれば、TPI の場合にも、高い CaCl_2 濃度域ではアシル基の混合のエンタルピーの寄与は負となり、PS の場合のそれと同じになる。したがって TPI のアシル基が混合のエンタルピーに正の寄与をするのは初期の低 CaCl_2 濃度域のみであると考えられる。

PS および TPI の分散系に CaCl_2 を添加すると、それらの分散粒子は会合し、 Ca^{2+} 濃度が高くなると沈澱を生ずる。図4にみられるように PS の場合には、濁度は単調かつ急激に増大するが、TPI の場合には一旦プラトー値を保持したのち、急激な濁度の増大が始まる。混合熱測定のため、PS および TPI でみられる発熱性の反応はリン脂質分散系の会合に起因するものと解釈される。

4. 疎水性領域への水の浸透と Ca^{2+} の結合に伴う放出

TPI 分散系に CaCl_2 水溶液を添加したとき、低 CaCl_2 濃度域で生ずる鋭い立ち上りの吸熱反応は、すでに述べたように TPI のリン酸基への Ca^{2+} の結合をひきがねにして起る、アシル基の脱疎水性水和である可能性が高い。 CaCl_2 水溶液の代りに、 MgCl_2 水溶液を用いた場合にも、 Ca^{2+} のときほど大きくはないがやはり吸熱反応が起ることからみて、2 価イオンが脱水和のひきがねになっているものと考えられる。 Ca^{2+} の結合にともなう TPI に疎水性水和した水が自由水になるとすれば、その過程では当然エントロピーの増大が期待される。仮に TPI- NH_4 分散系の表面のリン酸イオンが完全に解離していると仮定すると(実際には解離は不完全であると考えられる)、TPI イオンへの Ca^{2+} の結合は次式で表わされる。



Ca^{2+} イオン電極を用い、混合前後の Ca^{2+} 濃度を測

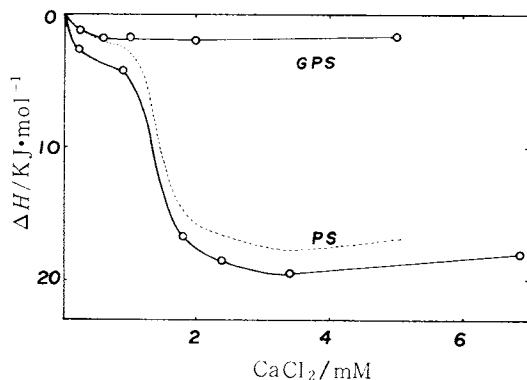


Fig. 3 Mixing enthalpies of the aqueous dispersions of PS and GPS (a head group of PS) solutions with CaCl_2 solutions. A dotted line represents $\Delta H_{\text{PS-Ca}} - \Delta H_{\text{GPS-Ca}}$.

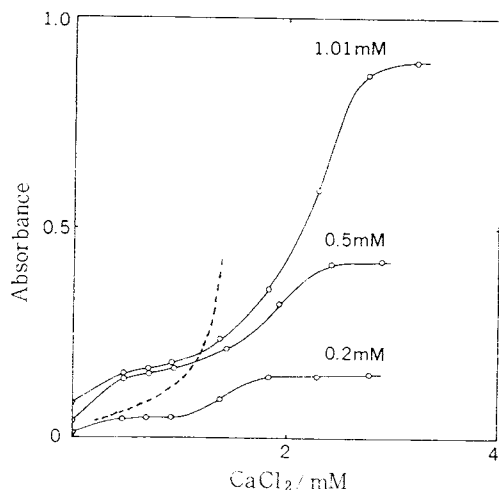


Fig. 4 Effect of the addition of CaCl_2 on the absorbance changes of the aqueous dispersions of TPI (solid line) and PS (dotted line). Concentrations are shown in the figure.

定して、この反応の平衡定数を求め、それより混合の自由エネルギーを見積ると、 ΔG として -55.2 kJ/mol の値が得られる。GPIDP についても同様な方法で Ca^{2+} の結合にともなう ΔG を求めると、 -45.1 kJ/mol となる。

一方、 CaCl_2 添加によるエンタルピーの増加としてはそのピーク値をとり、それらを用いて結合のエントロピー変化を見積ると、TPI 分散系では Ca^{2+} の結合によって、 $295 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ のエントロピー増加があり、GP

IDP水溶液では $141 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ のエントロピー増加があることになる。したがってその差の $154 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ のエントロピー増加は、TPIの炭化水素によってもたらされたものと解釈できる^{35,36)}。

例えばペンタン (C_5H_{12}) の場合、水和のエントロピーとして $188 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ という値が報告されていることからみて³⁷⁾、 $154 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ のエントロピーの増大をTPIの炭化水素鎖に水和した水の脱水和エントロピーとみるのは、オーダー的にみて妥当なところであろうと思われる。

2でみたように、アシル基として飽和脂肪酸をもつ中性のリン脂質の分散系でも、水はその疎水性領域にまで浸透している可能性が高い。TPI- NH_4^+ の場合には、イノシトールリン酸部分の正味の負電荷による、膜表面での分子間頭部の静斥的発働力と、グリセロールの2位の位置についている高度不飽和脂肪酸のアラキドン酸がとるかさばった立体構造とによって、疎水性の高い膜の内部は、すき間の多い構造になっているものと考えられる。したがって Ca^{2+} が膜に結合していないときには、ジバルミトイル・ホスファチジルコリンの場合よりも、より多量の水が、疎水性水和することが可能であろう。

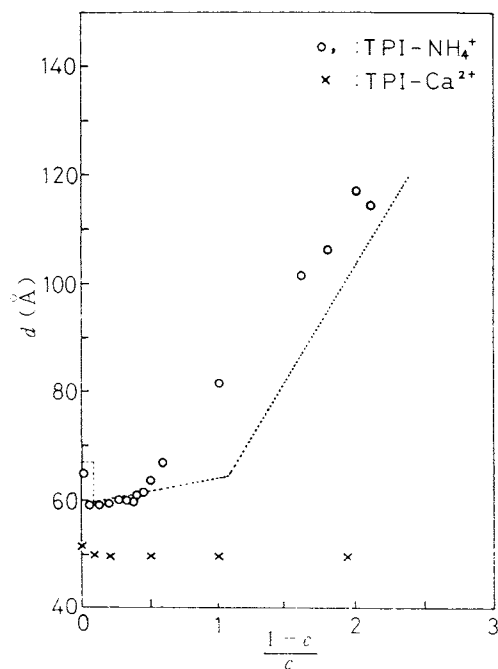


Fig. 5 The repeat distances of TPI lamellae versus water contents. c , the weight fraction of lipid. Dotted line, Sugiura's result.

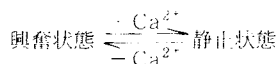
TPI-水系の構造に関する報告は、TPIの発見後間もなく行なわれた、沈降によるミセルの大きさに関するものを除けば³⁸⁾、杉浦および、その後三友らによって行なわれた、X線小角散乱等による研究報告以外には見当たらない^{39,40)}。図5は含水率を変えた場合のラメラ周期の変化を示したものである。杉浦の場合には含水率が1以下で、また三友らの場合には0.4以下で、水を加えても長周期は殆んど変わらない。

リン脂質-水系で、脂質の2分子膜構造を保ったまま、その長周期が一定に保たれるためには、水が層間に入るのではなく、層内に入っていくか、水は層間に入るが、そのとき入る水の量が増すにつれて、脂質2分子膜の厚さが薄くなるかしなければならぬ。後者の場合、脂質2分子膜が薄くなるためには、炭化水素鎖が膜面に対して傾くか、鎖が互いに入り組む(interdigit)しなければならぬが、どちらによるにしても、それが連続して起って、その結果として長周期が一定に保たれなければならない。そのようなことが起っているとは考えにくい。なお、長周期が一定に保たれる含水率の領域が、杉浦の報告と三友らの報告で一致していないのは、測定に用いたTPIが完全な NH_4 塩であるか、あるいは酸の形が残っているかの差に基づくものらしいことが、その後のわれわれの研究でわかっている⁴¹⁾。

ところで熱測定は、これらのX線による測定が行なわれた含水率域よりも、はるかに高い含水率のところで行なわれている。そのような高含水率域でもTPI分散系はラメラ構造をとっているか否かは、実験的に確認しなければならない。TPI-水系の相図に関して行なわれわれの研究によれば、含水率が1以上で、濃度が室温よりも高いとき、TPI分散系はヘキサゴナルな構造をとり、室温ではラメラとヘキサゴナルが混在している⁴¹⁾。

しかし、TPI分子の集合体が棒状の構造をとるにしても、その内部の疎水性領域には、やはり多量の水が浸透しているものと考えられる。そして、膜または棒状構造の表面に Ca^{2+} が結合すると、疎水性水和していた内部の水は、外に放出される。したがってTPI分散系に対する Ca^{2+} の作用を模式化すると、Fig.6のように表わされる。

他方、3で述べたように、神経膜もその表面に Ca^{2+} が結合すると、次式で表わされるようにその状態を変える³⁰⁾。



静止状態から興奮状態に移る過程は発熱 ($\Delta H < 0$) であり、このとき膜内部で、1価イオンの透過を担う物質の回りの水はより規則的な構造をとり、系のエントロピーは減少する ($\Delta S < 0$) のものと考えられた³⁰⁾。したがっ

て、疎水性水和したTPI集合体を膜の興奮状態に対応させ、 Ca^{2+} の結合により脱水和したTPI集合体を膜の静止状態に対応させるならば、 Ca^{2+} を添加したときの熱力学的パラメータの変化の傾向は両系で一致する。

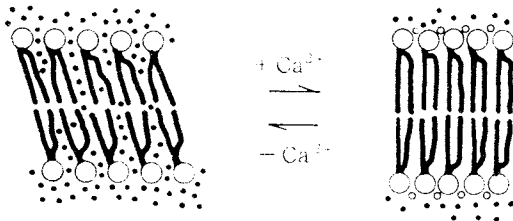


Fig. 6 A schematic model representing the effect of Ca^{2+} ions on the structure of TPI in the aqueous dispersions.

一般にリン脂質膜系では、水を含むにつれてその親水基の占有面積が増加し、全体として膜内の脂質分子のパッキングは疎になるが、そのような状態の膜表面に2価イオンが結合すると、膜のパッキングが再び密になる傾向がある^{4,2)}。

さきに述べたようにTPIは、イノシトールに3個のリン酸基の付いた、高度の親水基をその頭部を持つため、水と面した膜面での分子占有面積は大きい。さらに2位のアシル基がアラキドン酸であるため、親水基に2価イオンが結合していないとき、そのパッキングはかなり疎になっている。そのような状態では、水や1価イオンは比較的自由にTPIの2分子膜を通り抜けることができよう。しかしながら、膜表面に2価イオンが結合すると膜の疎水性が強まり、水や1価イオンは膜を通り抜けられなくなる。

さてこのように、 Ca^{2+} の作用によってTPI分散系を作っている膜のパッキングが密になるとすれば、その分散粒子の粒径も小さくなることが予想される。非弾性光散乱法により、TPI分散粒子の粒径を測定した結果、混合エンタルピーが極大になる Ca^{2+} 濃度までは、粒径が減少し、それ以上になると増加するという結果が得られた^{43,44)}(図7)。これは混合熱測定の結果に基づいて予想したように、 Ca^{2+} の添加による低 Ca^{2+} 濃度域での水の放出過程と、さらに高濃度域での分散粒子の会合という推定を裏付けるものである。

なおここで、TPIの機能に関わる異なった角度からの研究について、簡単にふれておこう。まず初期の神経化学的研究によって、TPIとDPIとの代謝回転は非常に速いことがわかり、TPIはDPIに比べてはるかに高い Ca^{2+} 親和性を示すことからみて、 $\text{TPI} \rightleftharpoons \text{DPI}$ の反応

が細胞内 Ca^{2+} の調節に役立っているものと考えられた⁴⁵⁾。

また最近になると、別の観点から、TPIは脚光をあびる分子となっている。即ち、種々の外界の信号を受けて膜内にあるホスホリパーゼCが活性化し、やはり膜内にあるTPIからイノシトール-3-リン酸を遊離させる。そしてこの遊離したイノシトール-3-リン酸がセカンドメッセンジャー分子として、細胞内を移動してCa小胞膜に付着する。するとCa小胞は細胞内に Ca^{2+} を放出する。この放出された Ca^{2+} は細胞内の諸反応の調節因子として作用する⁴⁶⁾。現在、このような仮説にもとづいて、非常に多くの研究が行なわれている。

われわれのTPIに関する物性的研究は、TPIの代謝回転に関わるものではないし、膜内におけるTPIの機能的役割に直接結びつくものでもない。しかしTPIが、ある種の生物学的役割を担う物質であると仮定したとき、そのために必要となる性質をもつかどうかについては、物性的研究により答えることが出来る場合もある。一般的にみても、生物のある種のメカニズムを解明するために、モデル物質を物性的に研究する手法の役割はこの辺にある。

5. 不飽和アシル基の役割^{47,48)}

TPIが高度不飽和脂肪酸のアラキドン酸を含んでいることはくり返し述べて来た。一般に天然のリン脂質ではグリセロールの2位に不飽和脂肪酸を結合している場合が多い。生物の持っている高度に合目的な構造から推

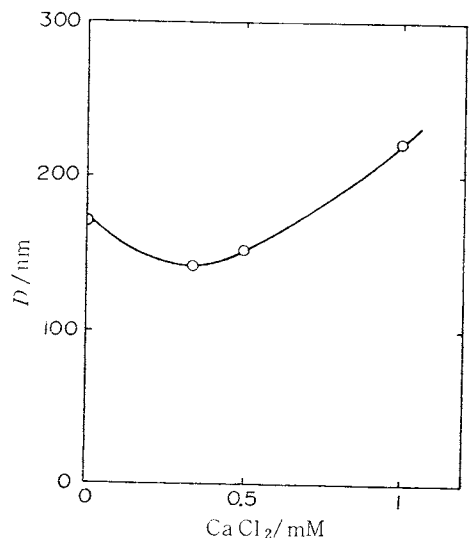


Fig. 7 The mean diameters of the dispersed particles as a function of CaCl_2 concentration.

して、この不飽和脂肪酸にも飽和脂肪酸では代替できない、何らかの理由があるものと考えるのはそうはずれのことでなかろう。

不飽和脂肪酸は、リン脂質の相転移温度を下げる役割を持っていることは良く知られている。ある種の生物を低温で育成するとき、それが持っているリン脂質にはそれまでになかった不飽和脂肪酸がとり込まれるようになり、そのことによって細胞膜はその転移温度を下げ、低温でも膜の流動性を保つことができる。

ここではわれわれは、水や1価イオンの膜透過能という別の観点から、不飽和脂肪酸の役割を検討した。試料としては各種のアシル基をもつ、合成ホスファチジルコリンを用いた。Fig.8はアシル基を変えたPCの水蒸気に対する吸着重量の時間的変化を示したものである。牛脳のTPIと同じく、グリセロールの1位にステアリン酸を、2位にはアラキドン酸をもった1S-2A-PCの場合には、両鎖とも飽和型のアシル基を持ったPCに比べると、その初期吸着速度は遅いにもかかわらず、吸着量は序々に増え続けるため、平衡時の吸着量は最も多い(図8)。

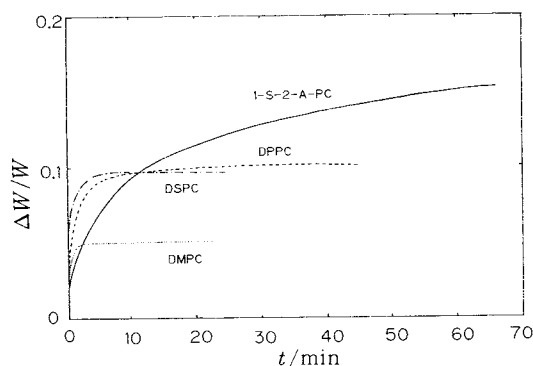


Fig. 8 Water adsorptions by dimyristoyl-PC, dipalmitoyl-PC, distearoyl-PC and 1-stearoyl-2-arachidonoyl-PC (20 °C, 81% RH).

次に図9はDPPCの吸着平衡曲線と1S-2A-PCのそれとを比較したものである。DPPCの吸着平衡曲線は、比較的強い結合の第1層吸着とそれにひき続く多層吸着が起るときみられる、2段階型の曲線であり、古く Elworthy によっても報告されている⁴⁹⁾。1S-2A-PCの吸着平衡曲線はDPPCのものとは大変異なり、低蒸気圧域での吸着量は少ないが、蒸気圧が高くなるにつれて急激に増加する。一般に疎水性の表面をもつ細孔への吸着は、この型の曲線になることが知られている⁵⁰⁾。

また、DPPCと1S-2A-PCについて、水蒸気吸着

時の熱発生と、重量変化の時間経過とを、同一測定系内で測定した結果が、図10と図11に示されている。これらの図で特徴的なことは、吸着熱の発生がDPPCと1S-2A-PCとではほぼ同一時間内に完了しているにもかかわらず、1S-2A-PCでは、ほとんど発熱を伴わない重量

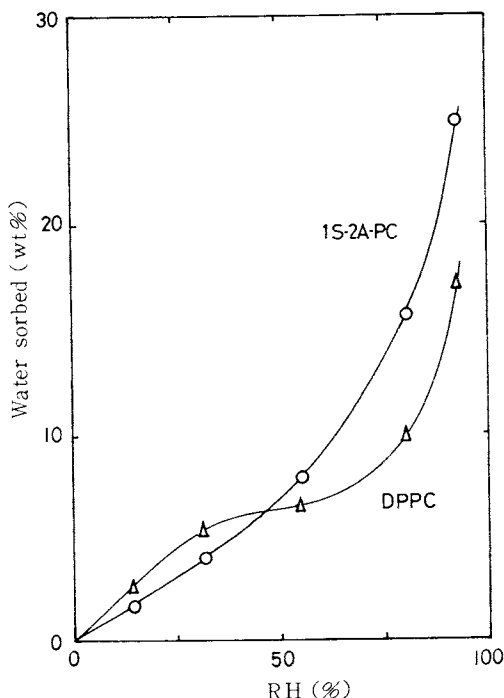


Fig. 9 The adsorption isotherms for DPPC and 1S-2A-PC.

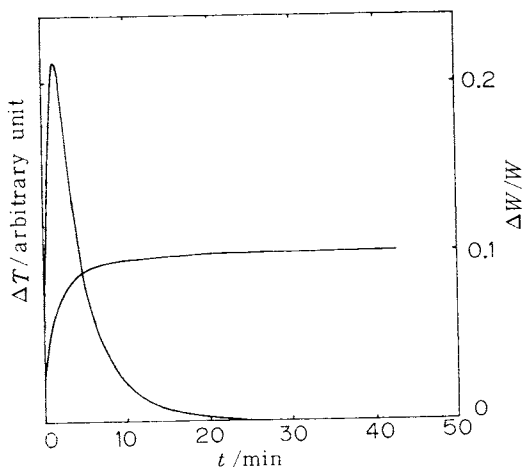


Fig. 10 The weight increase and the heat of adsorption for DPPC.

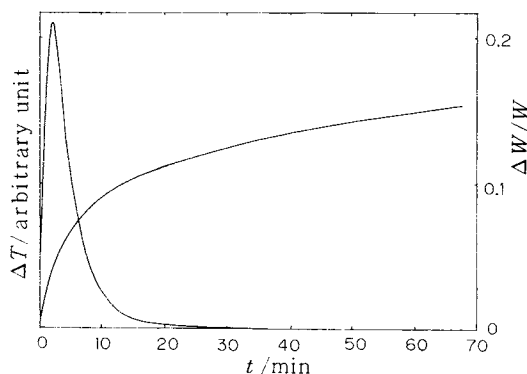


Fig. 11 The weight increase and the heat of adsorption for 1S-2A-PC.

増加がその後も続いていることである⁴⁷⁾。

DPPC 一水系が典型的なラメラ構造をとることは良く知られているが、1S-2A-PC 一水系の場合にも、そのX線回折像は、ラメラ構造に特徴的な高次の回折線を持っている⁵¹⁾。DPPC と 1S-2A-PC とで、その水蒸気吸着熱の発生の時間的経過が似通っていることからみて、たぶんその熱発生は、親水性表面への水蒸気吸着によるものであろう。

そしてその後の、認められるほどの熱発生なしに進行する1S-2A-PCへの水蒸気吸着は、Fig. 9の吸着平衡曲線からも読み取れるように、膜内部の疎水的な空孔への水蒸気吸着である可能性が高い。グリセリンの2位に結合しているアラモドン酸のために1S-2A-PCの疎水性部分はすき間の多いパッキングになっており、その部分に水蒸気が吸着することによって、ゆっくりした重量増加が続くものと解釈される。

6. おわりに

すでに述べたように熱測定は、リン脂質一水系の性質を解明するために有力な研究手段である。比較的希薄な分散系で、比熱の絶対値を精密に測定できれば、本稿で紹介したような方法で、リン脂質の部分分子熱容量を求め、その結果に基づいて、膜の構造につながる議論をすることも可能になる。そのような研究によって、リン脂質二重層内部の疎水性領域には、水分子が浸透しているらしいことが推測された。

また微量熱量計の感度が向上したことによって、少量の試料で混合熱測定を行うことが可能となり、少量しか入手できないTPIのような、生体系の機能的物質についても、生理的現象に並行する形で種々の条件を変えて、混合熱測定を行なうことができる。本稿で紹介したTPI

分散系の場合には、膜面への Ca^{2+} の結合にともなって、膜内部で疎水性水和水していた水が、自由水として膜外に放出されるらしいことがわかった。

また疎水性領域に入り込んでいる水の性質を、熱測定により解明するためには、低温での走査熱量測定によって、水の融解特性を調べるのが有効であるが、本稿ではふれなかった。

以上述べてきたように熱測定は、膜の水和状態を研究する手段としてきわめて有効ではあるが、それに基づいてなされる構造についての議論はどこまでも推論でしかあり得ない。膜の構造についての最終的な知見は、X線または中性子線による構造解析と、各種のスペクトロスコピーの結果に待たなければならない。

熱測定は、系のエネルギーについての総合的な知見を与える点にこそ、その独自の役割があるのは勿論であるが、温度またはその他のパラメータを変えたとき起こる、構造変化の微妙な知見を与えるものとしても、熱測定の役割が強調されても良いであろう。構造解析法だけでは見落されがちな現象に、熱測定による光を当てることは十分可能であろう。

物性測定には一定量の高純度試料を入手しなければならない。しかし、機能⁵²⁾にみて興味のある生化学物質を物性測定に必要なだけ多量に抽出・精製するのは、概して大変困難である。TPI もその例にみれず、しかもTPIは光や熱に対して不安定である。本稿で紹介したTPIの物性研究に用いた試料は、すべて、茨城大学の林教授によって抽出・精製された。同教授は、水溶性複合脂質の生理的役割の解明のためには、基礎的物性の研究が必要であることを、一貫して主張して来られた。TPIの物性研究は、そのような意欲にもえる同教授との共同研究であることを付記し、ここに心から感謝のことばを述べて頂きます。また、本稿の執筆をお勧め頂いた農業資源研究所の馬越淳博士に感謝致します。

文 献

- 1) 香川靖雄, 生体膜, 岩波出版社, 東京 (1978).
- 2) S.J. Singer, G.L. Nicolson, *Science* **175**, 720 (1972).
- 3) K. Yoshikawa, O. Omochi, T. Ishii, Y. Kuroda, K. Iriyama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **133**, 740 (1985).
- 4) T. Ishii, Y. Kuroda, T. Omochi, K. Yoshikawa, *Langmuir* **2**, 319 (1986).
- 5) T. Nomura, K. Kurihara, *Biochemistry* **26**, 6135 (1987).
- 6) T. Nomura, K. Kurihara, *Biochemistry* **27**,

- 1239 (1988).
- 7) J.W. Nicholos, D.W. Deamer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 165 (1983).
- 8) M. Rossignol, P. Thomas, Grignon, *Biochim. Biophys. Acta* **684**, 195 (1982).
- 9) D.A. Wilkinson, *Biochim. Biophys. Acta* **688**, 107 (1982).
- 10) A. Blume, *Biochemistry* **22**, 5436 (1983).
- 11) P.L. Privalov, V.V. Plotnikov, V.V. Filimonov, *J. Chem. Thermodyn.* **7**, 41 (1975).
- 12) F. Franks, *Water*, Vol. 4, F. Franks, Ed., (Plenum, New York, 1975). p.12.
- 13) H. Rüterjans, F. Schreiner, U. Sage, Th. Ackermann, *J. Phys. Chem.* **73**, 986 (1968).
- 14) E.M. Arnett, W.B. Kover, J.V. Carter, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 4028 (1969).
- 15) N. Nichols, R. Skold, C. Spink, J. Suurkuusk, I. Wadsö, *J. Chem. Thermodyn.* **8**, 1081 (1976).
- 16) S. Cabani, G. Conti, E. Matteoli, A. Tani, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **173**, 476 (1977).
- 17) G. Roux, G. Perron, J.E. Desnoyer, *Can. J. Chem.* **56**, 2808 (1978).
- 18) J.F. Messerly, G.B. Guthrie, S.S. Todd, H.L. Finke, *J. Chem. Eng. Data* **12**, 338 (1967).
- 19) O.H. Griffith, P.J. Dehlinger, S.P. Van, *J. Membr. Biol.* **15**, 159 (1974).
- 20) S.A. Simon, T.J. McIntosh, A.R. Latorre, *Science* (Washington D.C.) **216**, 65 (1982).
- 21) R.G. Ashcroft, H.G.L. Coster, J.R. Smith, *Biochim. Biophys. Acta* **643**, 191 (1981).
- 22) G. Büldt, H.V. Gally, A. Seeling, J. Seeling, G. Zaccai, *Nature* (London) **271**, 182 (1978).
- 23) G. Zaccai, G. Büldt, A. Seeling, J. Seeling, *J. Mol. Biol.* **134**, 693 (1979).
- 24) T. Takizawa, K. Hayashi, S. Yabuki, Y. Nakata, *Thermochimica Acta* **123**, 247 (1988).
- 25) 林浩平, 膜 **2**, 86 (1977).
- 26) J.N. Hawthorne, P. Kemp, *Adv. Lipid Res.* **2**, 127 (1964).
- 27) M. Kai, J.N. Hawthorne, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **165**, 761 (1969).
- 28) A.C. Birnberger, K.L. Birnberger, S.L. Eliasson, P.C. Simpson, *J. Neurochemistry* **18**, 1291 (1971).
- 29) A.L. Hodgkin, A.F. Huxley, *J. Physiol.* **117**, 500 (1952).
- 30) T. Tasaki, Never Excitation, A Molecular Approach, Charles C. Thomas, Illinois (1968).
- 31) I. Tasaki, Physiology and Electrochemistry of Nerve Fibers, Academic Press, New York (1982).
- 32) J. Folch, *J. Biol. Chem.* **177**, 497 (1949).
- 33) J.S. Hendrickson C.E. Ballow, *J. Biol. Chem.* **239**, 369 (1964).
- 34) J.N. Hawthorne, G. Hubsher, *Biochem. J.* **71**, 195 (1959).
- 35) T. Takizawa, K. Hayashi, *Rept. Prog. Polym. Phys. Japan* **24**, 615 (1981).
- 36) T. Takizawa, K. Hayashi, *Gunma J. Liberal Art and Science* **17**, 17 (1983).
- 37) F. Franks, D.S. Reid, *Water*, Vol. 2, F. Franks, Ed., (Prenum Press, New York, 1973).
- 38) H.S. Hendrickson, *Ann. New York Acad. Sci.* **165**, 668 (1965).
- 39) Y. Sugiura, *Biochim. Biophys. Acta* **641**, 148 (1981).
- 40) H. Mitomo, S. Yabuki, T. Takizawa, K. Hayashi, *Rept. Prog. Polym. Sci. Japan* **27**, 677 (1984).
- 41) T. Takizawa, A. Gulik, V. Luzzati, *unpublished data*.
- 42) H. Hauser, *Water*, Vol. 4, F. Franks, Ed., (Prenum Press, New York, 1975) p.300.
- 43) T. Takizawa, K. Hayashi, S. Yabuki, *Rept. Prog. Polym. Phys. Japan* **27**, 683 (1984).
- 44) S. Yabuki, T. Takizawa, K. Hayashi, *Rept. Prog. Polym. Phys. Japan* **29**, 715 (1986).
- 45) J.T. Buckley, J.N. Hawthorne, *J. Biol. Chem.* **247**, 7218 (1972).
- 46) M.J. Berridge, P.F. Irrine, *Nature* **312**, 315 (1984).
- 47) T. Takizawa, A. Takahashi, H. Mitomo, *Rept. Prog. Polym. Phys. Japan* **30**, 705 (1987).
- 48) T. Takizawa, H. Mitomo, K. Hayashi, S. Yabuki, A. Takahashi, *Rept. Prog. Polym. Phys. Japan* **31**, 603 (1988).
- 49) P.H. Elwothy, *J. Chem. Soc.* 5385 (1961).
- 50) A.C. Zettlemoyer, F.J. Micale, K. Klier, *Water*, Vol. 5, F. Franks, Ed., (Prenum Press, New York, 1975) p.249.
- 51) T. Takizawa, 10th IUPAC Conference on Chemical Thermodynamics, Prague, 1988.