

生体膜モデル・リン脂質ベシクルの熱特性と 熱力学的安定性に関する研究

高市恭弘, 橘高茂治, 児玉美智子*

(平成4年2月21日受理)

Calorimetric Investigations of Phase Transitions of Sonicated Vesicles of Dimyristoylphosphatidylcholine and Their Stabilities

Yasuhiro Takaichi, Shigeharu Kittaka and Michiko Kodama*

(Received February 21, 1992)

The process of transformation of a large multilamellar vesicle (MLV) composed of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) into a small unilamellar vesicle (SUV) brought about by ultrasonic irradiation was calorimetrically investigated. It was found that the final state of SUV is attained by way of a large vesicle of unilamellar-like packing, which appears with an increase in length of the irradiation. Representative three types of vesicles of different sizes and lamellar multiplicities, i.e., sonicated SUV, sonicated large unilamellar-like vesicle, and unsonicated MLV, showed a characteristic thermotropic behavior of the phase transition of the gel to liquid crystal (T_m transition). The enthalpy and entropy changes, and also the transition temperature associated with the T_m transition increased in the order SUV < large unilamellar-like vesicle < MLV. Furthermore, the annealing treatment at approximately -5°C caused the SUV to transform finally into a vesicle of multilamellar packing by way of the large unilamellar-like vesicle. The schematic diagram of Gibbs energy (G)-vs-temperature (T) curves for the gel phase were revealed to lower in the order SUV < large unilamellar-like vesicle < MLV, similar to the enthalpy (H)-vs-temperature (T) curves for this phase. This fact indicated that DMPC vesicles are thermodynamically stabilized by the enthalpy effect resulting from a closely packed aggregation of the lipid molecules.

1. 序 論

生体膜は、タンパク質、コレステロールおよび脂質を主要な構成成分とし、これらの生体高分子が分子集合体を構築することで、生体機能を発現していると考えられる。上述の脂質は、生体膜全重量の～60%を占める膜主成分であるが、中でもその大部分はリン酸基を有するリン脂質である。生体膜の構造はSinger-Nicolsonの流

動モザイクモデルによって代表されるが、ここでの脂質分子は生体膜の基本的骨格構造である二分子膜(bilayer)を形成している。生体膜は、細胞間のバリアー(障壁)として働くが、そのほか、物質やエネルギーの生体代謝、あるいは化学シグナルの受容・応答・伝達等の情報交換にも関与する。従って、今日、この生体膜の構造と機能の関係を解明することが極めて重要な課題となっている。

リン脂質は生体系における典型的な両親媒性物質(amphiphile)であるが、一般に両親媒性物質は界面活性剤分子によるミセル形成に代表されるように、ある特定条件下での水の共存下で特異的な分子集合体を形成する。脂質分子を単独で水に懸濁すると、二分子膜を基本

岡山理科大学理学部：岡山市理大町1-1 〒700

Faculty of Science, Okayama University of Science: 1-1,
Ridai-Cho, Okayama 700, Japan

構造とする閉鎖性の小胞体が形成されるが、これは、今日、ベシクル(vesicle)あるいはリポソーム(liposome)と呼ばれている¹⁾。このベシクルは1964年にBangham²⁾によって発見されたが、これは生体膜の基本構造を有することから、今日、人工の生体膜および細胞膜モデルとして盛んに利用されている。

しかし、ここで問題となることは“ベシクルの不安定性”である。すなわち、調製されたベシクルが熱力学的に不安定な状態で存在するならば、このベシクルは時間経過とともにその形態を徐々に変化させて、より熱力学的に安定な状態へと移行して行くだろう。その結果、任意の時間経過後には当初の目的とは異なるベシクルを追跡することにもなりかねない。従って、ベシクルを用いた研究においては、まず“ベシクルの熱力学的安定性問題の解決”が研究の出発点として不可欠であると考えられる³⁾。

本研究では、リン脂質ベシクルの有するゲル-液晶相転移に伴われるエンタルピーおよびエントロピー変化量、あるいは転移温度を高感度示差走査熱量計を用いて測定し、これらの熱力学的諸量を基にして、サイズおよび層の多重性が異なる種々ベシクルの熱力学的安定性を検討した。

2. 実験

2.1 試料

リン脂質Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)は、Sigma Chemical Co. より購入し、精製を行わないで用いた。この脂質の純度は、展開溶媒として $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{NH}_3 = 230 : 90 : 15$ を用いてsilica-gel plate (E. Merck)による薄層クロマトグラフィー(TLC)によって検定したが、単一スポットが得られた⁴⁾。リン脂質濃度は、リン脂質を酸化分解後、リン酸として定量するBartlett法の改良法によって決定した⁵⁾。

蛍光異方性の実験に用いた1, 6-Diphenyl-1, 3, 5-hexatriene (DPH)は、NACALAI TESQUE, INC. より購入した。

2.2 ベシクルの調製

DMPC (~27 mg) をナス型フラスコに入れ、~3 ml のクロロホルムを加えて溶解させた。次に、ロータリーエバポレーターを用いてクロロホルムを除去し、DMPCの薄膜を作製した。さらに高真空下(10^{-4} Pa)で完全にクロロホルムを除去した。得られた薄膜に、2 mlのTris-HCl緩衝液(20 mM-Tris, 200 mM-NaCl, pH=7.40)を加え、~40°C(ベシクルのゲル-液晶相転移温度以上)温度で膨潤、振とうすることによって~20 mM濃度の大きいサイズの多重膜ベシクル

(multilamellar vesicle: MLV)の懸濁液を調製した^{2,6)}。

また、小さいサイズの単重膜ベシクル(small unilamellar vesicle: SUV)は、上述のMLVに超音波照射を施すことによって調製した^{7,8)}。超音波照射装置は、Branson社製の浴槽型Sonifier 450(最大出力:400W)を用いたが、これはカップホーン型の粉碎器を有する。超音波照射は、照射の出力(13~200W)および時間(0~120分)、さらに試料の温度(5~50°C)を変えて行ったが、温度の調節には循環恒温槽を用いた。また、MLV(~20 mM)懸濁液を栓付試験管に入れ、脂質の酸化を防ぐために窒素ガスを封入した。

超音波照射によるリン脂質分子の化学分解および酸化についてはTLCによって検討した。本研究において用いた試料は全て単一のスポットを与え、化学分解などの影響は認められなかった⁴⁾。

2.3 高感度示差走査熱量測定(Differential Scanning Calorimetry: DSC)

昇・降温示差走査熱量測定の実験は、Microcal社(U. S. A.)製・MC-2型高感度示差走査熱量計を用いて行った。この熱量計はA/D-converter(Data Translation DT-2801)内蔵のIBM-PS. 2 computerによって、データの取り込み、解析および熱量計の制御が行われる。降温熱測定はcomputer制御された高精度循環恒温槽HAAKE F3-Cを用いて行った。また、熱量計のセル体積1.2 mlに対し、用いた脂質濃度は1~2 mMである。温度走査速度(scan rate)は昇温測定では45°C/h、降温測定では-30°C/hをそれぞれ用いた。

2.4 電子顕微鏡観察

電子顕微鏡観察は、日本電子社製・透過型電子顕微鏡JEM-2000EX(加速電圧200KV)を用い、ネガティブ染色法によって行った^{8,9)}。染色剤としては2%(w/v)-リンタングステン酸(pH=7.4)を用いた。グリッドには、銅製メッシュにコロジオン支持膜を張り更にカーボン蒸着をしたものを用いた。ベシクル標本は、このグリッド上にベシクル試料(1~5 μmol/ml)一滴を滴下し、これに染色剤を加え、余分の溶液を排水した後乾燥させて作製した。これらの操作は全て~20°Cで行った。

2.5 蛍光偏光異方性測定

蛍光偏光異方性測定¹⁰⁾は、堀場製作所製・時間分解蛍光分光光度計NAES-1100を用い、リン脂質二分子膜の疎水部にDPHを可溶化し、この蛍光分子の異方性を温度の関数として測定した。試料温度は循環恒温槽を用いて目的温度に制御した。測定は降温方向で段階的に試料温度を変えることで行ったが、少なくとも30分以上、目的温度に試料を保った後に測定を開始した。DPHは360 nm

波長の光で励起し、その蛍光強度は430nmの波長で測定した。410nm以下の波長の光を遮るためにL42 cut-off filterを用いた。

DPHのアセトニトリルストック溶液をベシクル試料に加えたが、DPH/Lipid=1/100になるように調整した。その後、この混合試料を~40°Cで約1時間保つことよって試料の平衡を達成させた。また測定に用いた脂質濃度は0.5mMである。

蛍光異方性(r_s)は、次式によって求めた。

$$r_s = \frac{I_{vv} - g \cdot I_{vH}}{I_{vv} - 2 \cdot g \cdot I_{vH}}$$

I_{vv} : 鉛直偏光の光で励起するときの鉛直偏光の蛍光強度

I_{vH} : 鉛直偏光の光で励起するときの水平偏光の蛍光強度

g : 鉛直偏光と水平偏光の光に対する測定系の装置に基づく因子

3. 結 果

3.1 超音波照射によって調製されたベシクルの熱的挙動

種々の条件下での超音波照射によって調製されたベシクルの熱的挙動を上述の熱量計を用いて検討したが、その結果を以下に記述する。

3.1.1 異なる超音波照射時間で調製されたベシクルの熱的挙動

Fig. 1は、照射出力(~25W)および試料温度(15°C)一定の条件下で、照射時間のみを0~120分まで変化させて得られたMLVのSUVへの移行過程を示す。Fig. 1aは、超音波照射を施していない(照射時間:0)MLVの熱的挙動を示すが、15.4°Cに L_{β}' ゲルから P_{β}' ゲル相への転移に伴う小さな前駆転移(T_p)ピークと、25.4°Cにゲル-液晶相転移に伴う極めて先鋭な主転移(T_m)ピークが観察された^{11,12)}。このMLVに上述の条件下で超音波照射を施すと、Fig. 1a~cに示すように、照射時間の増大に伴って T_p ピークの面積は徐々に減少し、 T_m ピークはブロードな形状へと徐々に移行した。照射時間30分後には小さな T_p ピークと最もブロードな形状を示す T_m ピークとが観察された。この照射時間をわずかに越えると、ブロードな T_m ピークの低温側に新しい肩ピークが出現した(Fig. 1c参照)。この低温側のピークは、Fig. 1d~eに示すように照射時間の増大に伴って徐々に生長するが、それとは逆に高温側の T_m ピークの面積は徐々に減少した。照射時間が90分に達すると、この T_m ピークはほとんど消滅し、著しく生長した低温側のピークが観察された。このピークは、照射時間をさらに120

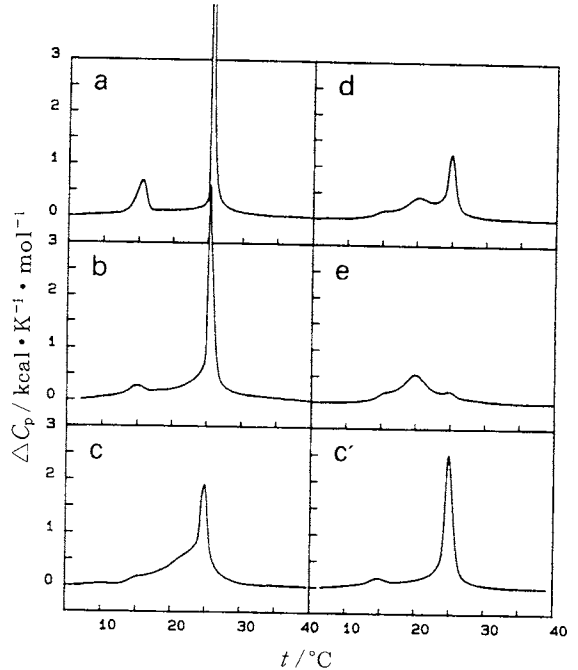


Fig. 1 Variation with increase in time length of ultrasonic irradiation of gel-to-liquid crystal phase transition of multilamellar vesicle of DMPC. Apparent, excess heat capacity (ΔC_p) per 1 mole of DMPC is plotted as a function of temperature (t). Irradiation time (min): (a) 0; (b) 15; (c) 35; (d) 60; (e) 90. (c') in this figure presents thermotropic behavior of sonicated, large vesicle of unilamellar-like packing (LUV-like vesicle) prepared by ultrasonic irradiation of minimum power of ~13 W and bath temperature of 11~13°C below the T_p transition temperature (see 3.1.3).

分まで延長してもピーク形状および転移温度に何ら変化を示さなかった。超音波照射によって新たに出現した低温側のピークは、高温側のブロードな T_m ピークの消滅に伴って生長することから、このピークも T_m 転移に基づくものであると考えられる。2種の T_m 転移ピークを区別するために、以後、高温側の第一に対して低温側の第二の T_m 転移と呼ぶ。Fig. 1eに示すように、第二の T_m ピークの低温および高温側に、 T_p および第一の T_m ピークにそれぞれ相当する小さな肩ピークがみられるが、これらは降温熱測定においては観察されない。これについては後述する。

Fig. 1からは、超音波照射によって調製されたベシクルが、照射時間に伴って特異的な熱的挙動を示すことが

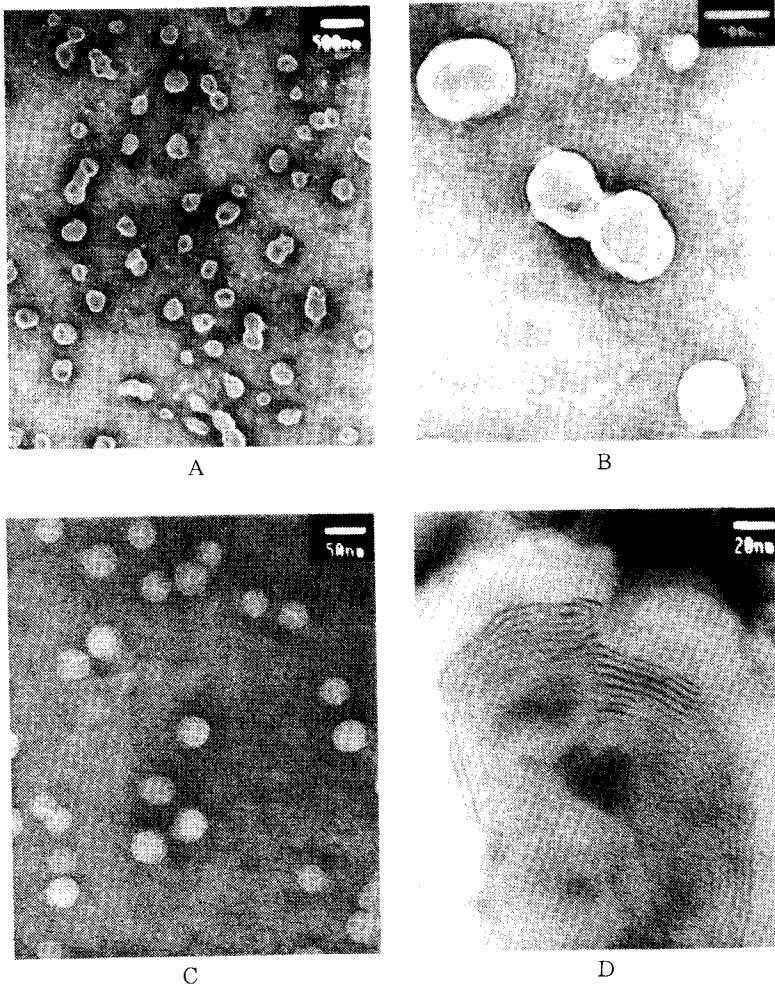


Fig. 2 Negative stain electron micrographs of DMPC vesicles: (A) Sonicated, LUV-like vesicles; (B) Enlarged micrograph of Fig. 2(A); (C) Sonicated, small vesicles; (D) Vesicle sample finally attained by annealing of ~30 days at ~-5°C.

明らかにされた。そこで熱的挙動が著しく異なる2種の代表的試料について電子顕微鏡観察を行ったのでその結果をFig. 2に示す。Fig. 2Aはブロードな第一の T_m ピークを示す試料 (Fig. 1c) の電子顕微鏡写真を示すが、この試料は直径約100~300 nmのサイズを有するベシクルから成ることが示される。これの拡大写真をFig. 2Bに示すが、これからは二分子膜が一重か、あるいは数重層かの明確な区別は出来ないが、ベシクル内部に内水相が存在することが示される。このベシクルは一般にLUV (large unilamellar vesicle) と呼ばれる大きいサイズの一重膜ベシクルか、あるいはそれにほぼ近いものに相当すると考えられる¹³⁾。

Fig. 2Cは、Fig. 1eの飽和した第二の T_m ピークを示す試料の電子顕微鏡写真を示す。この写真からは、この試料が平均直径~40 nmの小さいサイズの均一ベシクルから構成されることが示される。従って、このベシクルは内水相は確認出来ないが、SUVに相当すると考えられる^{8,13)}。

3.1.2 異なる超音波照射出力で調製されたベシクルの熱的挙動

照射時間および試料温度一定の条件下で、照射出力のみを変化させてMLVからSUVへの移行過程を検討した。Fig. 3は、照射時間および試料温度がそれぞれ60分および~30°Cで、出力を(a)13W、(b)25Wおよび(c)60

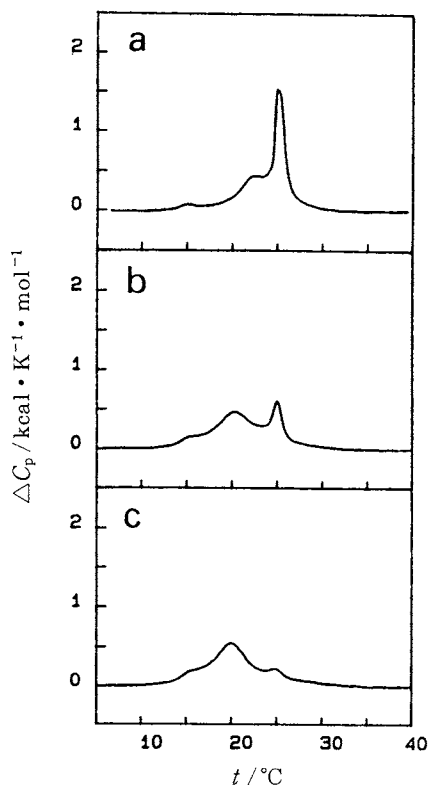


Fig. 3 Variation with increase in power of ultrasonic irradiation of gel-to-liquid crystal phase transition of multilamellar vesicles of DMPC. Apparent, excess heat capacity (ΔC_p) per 1 mole of DMPC is plotted as a function of temperature (t). Irradiation power (W): (a) 13; (b) 25; (c) 60.

Wと変化させて検討した結果であるが、照射出力の増大(a~c)に伴い、低温側の第二の T_m ピークの生長と、それとは逆に高温側の第一の T_m ピークの減少が観察された。また、第二の T_m ピークの転移温度は徐々に低温側へと移行した。照射出力が60Wに達すると、第二の T_m ピークはFig. 1eと同様の飽和形状を示し、さらに照射出力を200W(最大出力)まで増大しても何ら変化を示さなかった。

3.1.3 異なる試料温度での超音波照射によって調製されたベシクルの熱的挙動

Fig. 1dとFig. 3bの比較から、照射時の試料温度が高いほど、特にベシクルの相転移(T_m)以上の温度において、第二の T_m ピークの生長がより著しいことが示される。そこで、超音波照射の出力および時間を一定に保ち、照射時の試料温度の影響を検討した。試料温度を T_m 以上の50°Cまで上げて検討したが、Fig. 1e(or Fig. 3c)

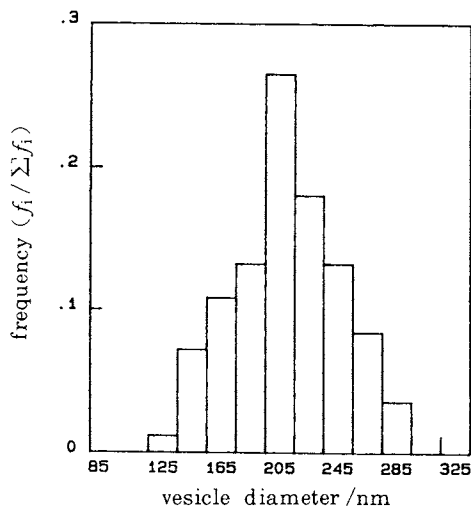


Fig. 4 Size distribution of sonicated, LUV-like vesicles of DMPC, obtained by counting ~200 vesicles in negative stain electron micrograph. Frequency, $f_i/\Sigma f_i$ ($=200$), is plotted as a function of the vesicle diameter.

に示される飽和形状の第二の T_m ピークは何ら影響されなかった。また、 T_m 以上の試料温度でしかも最大出力200Wを用いて照射すると、照射時間~15分で飽和型の第二の T_m ピークが出現し、照射時間をそれ以上増大してもこのピークに何ら変化はみられなかった

以上のことより、超音波照射によるSUVの作製には、照射出力、時間、さらに試料温度を含めた3種の条件が大きく影響することが明らかにされた。また、低温側の飽和型の第二 T_m ピークの出現は、分散系がSUVのみから構成されるということを示す。さらに、Fig. 1から明らかのように超音波照射によるMLVからSUVへの移行過程は、中間過程で出現するLUV状のベシクルを経て達成されることが明らかにされた。そこで、この大きいサイズで、しかも一重膜のベシクル(LUV)のみから構成される分散系を調製するための超音波照射条件を詳細に検討した。その結果、試料温度が T_p 以下で、しかも~13Wの弱い出力で照射を行うと、照射時間に無関係に第二の T_m ピークの生長は認められないという結果が明らかにされた。これに基づいて、~13Wの照射出力、11~13°Cの試料温度で、~60分の照射時間という限られた条件下で作製したベシクルの熱的挙動をFig. 1c'に示すが、 T_m ピークは極めてブロードな高温側の第一ピークのみによって特性化され、低温側の第二ピークの生長は全く認められなかった。このベシクルの分散系の電子顕微鏡観察から得られたサイズ分布をFig. 4に示すが、約90%の

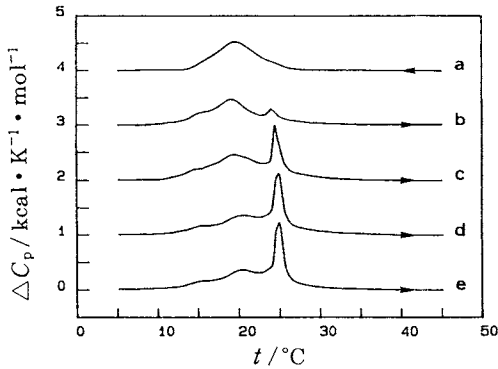


Fig. 5 Effect of repeated calorimetric cooling (←) and heating (→) scans on gel-to-liquid crystal phase transition of sonicated small vesicles of DMPC. Apparent, excess heat capacity (ΔC_p) per 1 mole of DMPC is plotted as a function of temperature (t). Repeated scan number: (a) 1; (b) 2; (c) 5; (d) 10; (e) 15.

ベシクルが150～250 nmの均一サイズを有し、粒度分布が極めて狭いことが示される。

3.1.4 種々ベシクルに対する熱処理の影響

Fig. 5は、超音波照射によって調製されたSUVの連続の昇・降温熱測定の結果を示す。測定に際しては、調製後の試料は直ちに熱量計セルに移され、降温方向での測定から開始した。

Fig. 5の曲線aは最初の降温測定の結果を示すが、低温側の第二の T_m ピークのみが観察された。その後の昇温測定の結果を曲線bに示すが、Fig. 1d (or Fig. 3c)と同じピーク形状および転移温度が観察された。曲線c～eは連続の昇温測定の結果を示すが、昇温を繰り返すことによって高温側の第一の T_m ピークは徐々に生長し、これとは逆に低温側の第二の T_m ピークは徐々に消滅した。この現象は、小さいサイズのベシクルが、大きいサイズのベシクルに移行することを示唆する。ここで、昇・降温熱測定における操作の違いを考慮すると^(注1)、昇温測定に伴われる5°C温度までの冷却操作によって、小さいサイズのベシクルの会合と、これに続く融合とが誘発され、その結果、大きいサイズのベシクルがもたらされると考えられる¹³⁻¹⁶⁾。

一方、曲線b～eに示すように、連続の昇温測定から

注1) 本研究の昇温熱測定では、測定を開始する前に、ベシクル試料を～5°Cの温度で少なくとも1時間保持する必要がある。また、降温熱測定では、試料を相転移以上の温度で同様の時間保持する必要がある。

はより低温側(～15°C)に出現する T_p ピークの生長は観察されない。これに関しては、 T_m 転移以下の温度で出現する P_{β}' ゲル相が、 T_p 転移以下の温度領域においても過冷却状態で存在することが理由として挙げられる¹²⁾。この過冷却ゲル相は、昇温測定に伴う冷却操作によって安定な L_{β}' ゲル相へと移行するので、これを昇温すると、 L_{β}' から P_{β}' ゲル相への転移に基づく T_p ピークが観察されるようになると思われる。

Fig. 5の曲線dとeを比較すると、連続の昇温測定が10回以上では、高温側の第一の T_m ピークの生長は限界に達することが示される¹⁴⁾。この結果は、第二から第一の T_m ピークへの完全な移行を達成するためには、～5°C温度までの冷却操作では、不十分であることを示す。そこで、この温度よりもさらに低温での熱処理を施し、熱処理時間の増大に伴う第一 T_m ピークへの移行過程を検討した。その結果をFig. 6に示すが、約20日間の熱処理によって、第二の T_m ピークは第一のピークへと完全に移行し(Fig. 6c)、そのピーク形状はFig. 1c'に示す T_m ピークに類似する。その後、約30日までの熱処理によって、このブロードな T_m ピークは極めて先鋭な形状へと最終的には移行する(Fig. 6d)。従って、Fig. 6に示す一連の T_m ピークの移行過程は、Fig. 1とは全く逆方向に進行することが示される。熱処理によって最終的に得られた試料(Fig. 6d)の電子顕微鏡写真をFig. 2Dに示すが、この写真からは膜が多重層構造であることが観察される。以上の結果から、超音波照射によって調製された小さいサイズのベシクルは、低温熱処理によってより安定な大きいサイズの一重膜状のベシクルへと徐々に移行し、最終的には、最も安定な多重膜構造のベシクルに至ることが明らかにされる。

また、上述の T_m 以下の温度での熱処理と平行して、 T_m 以上の温度での熱処理を種々のベシクルに施した。その結果、上述の方法(Fig. 1c')で調製された大きいサイズの一重膜状のベシクルは、多重膜のベシクルと同様に、約6ヶ月間の熱処理を施しても、それによって何ら影響されなかった。一方、超音波照射によって調製されたSUVは4日間の熱処理によって、Fig. 7bに示すように高温側に第一の T_m 転移に基づく小さいピークを示した。これはSUVの安定性が液晶相においても低いことを示唆する¹⁷⁾。

3.2 蛍光偏光異方性測定

Fig. 8は、SUVおよびLUV状ベシクルの膜の疎水部に可溶化されたDPH蛍光プローブの温度変化に対する蛍光偏光異方性を示す。この結果は、熱測定の結果に対応し、転移(T_m)温度付近で異方性の大きな変化が観察された。また、 T_m 以上の温度では2種のベシクルはほ

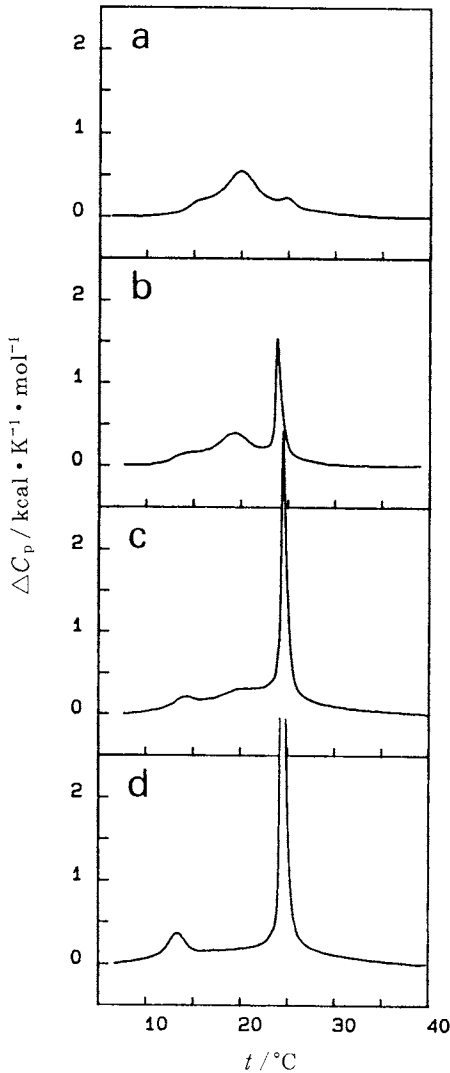


Fig. 6 Variation with increase in time length of annealing at $\sim 5^\circ\text{C}$ of gel-to-liquid crystal phase transition of sonicated, small vesicle. Apparent, excess heat capacity (ΔC_p) is plotted as a function of temperature (t). Annealing time (day): (a) 0; (b) 10; (c) 20; (d) 30.

ぼ同じ異方性を示すが、 T_m 以下の温度ではLUV状のベシクルがより大きな異方性を示す。これは、2種のベシクルの膜中の流動性は、液晶状態ではほぼ同じであるが、ゲル状態では異なること、すなわちサイズの大きいLUV状のベシクルの方が流動性が低いことを示す¹⁴⁾。

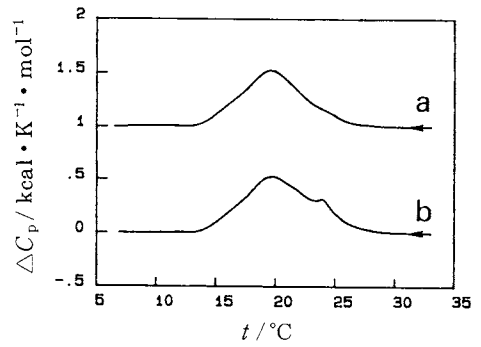


Fig. 7 Comparison of thermotropic behaviors of sonicated, small vesicles of DMPC: (a) immediately after preparation; and (b) after annealing of 4 days at 40°C . Both curves were obtained in cooling scans. Apparent, excess heat capacity (ΔC_p) is plotted as a function of temperature (t).

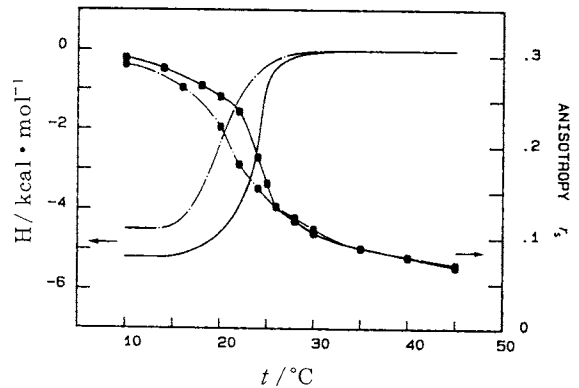


Fig. 8 Fluorescence anisotropies (r_s) of DPH solubilized in the hydrophobic core of lipid membranes of SUV (---) and LUV-like vesicle (—) (at the right-hand side) are compared with enthalpy (H) curves for both vesicles obtained by integrating ΔC_p - t curves shown in Fig. 9a and b, respectively (at the left-hand side).

4. 考 察

超音波照射はSUVを作製するための方法として広く利用されている。本研究においては、超音波照射を行う際の条件（時間、出力および温度）を詳細に検討することによって、SUVに至る中間段階にLUV（大きいサイズの一重膜ベシクル）状のベシクルが出現することを明らかにした。また、超音波照射によって作製されたSUV

Table 1 Transition temperatures (t_m), enthalpy (ΔH) and entropy (ΔS) changes, and also cooperative units associated with the phase transition of gel-to-liquid crystal (T_m transition) for sonicated SUV, sonicated LUV-like vesicle, and MLV composed of DMPC. Cooperative unit was given by a ratio of van't Hoff enthalpy change (ΔH_{vH}) to calorimetric enthalpy change (ΔH) shown in this Table. All thermal data were obtained from Fig. 9.

	SUV	LUV	MLV
$\frac{t_m}{^\circ\text{C}}$	19.5	25.0	25.4
$\frac{\Delta H}{\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}}$	4.5	5.2	6.7
$\frac{\Delta S}{\text{cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}}$	15.4	17.4	22.4
$\Delta H_{vH} / \Delta H$	24	55	369

1 calth (4.184J)

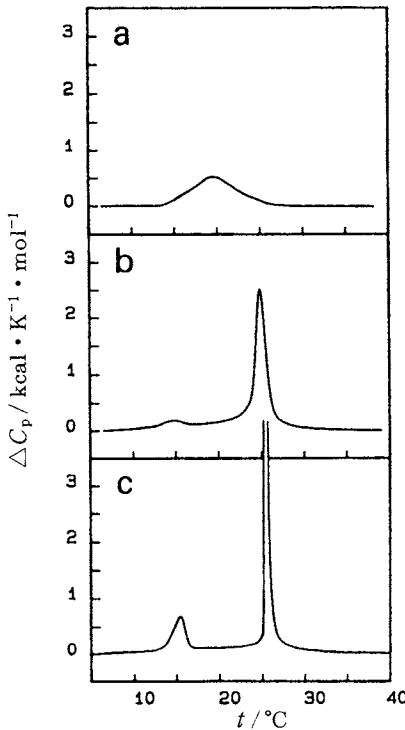


Fig. 9 Comparison of thermotropic behaviors of the T_m transition of sonicated SUV (a), sonicated LUV-like vesicle (b), and MLV (c) composed of DMPC.

は、転移以下の温度での熱処理によって、このLUV状のベシクルを経て、最終的には多重膜のベシクルへと移行することを明らかにした。

リン脂質ベシクルはサイズおよび層の多重性の相違に基づいて、SUV, LUVおよびMLVの3種に大別される。そこで、熱力学的観点からこれらベシクルの特性を考察するために、本研究で得られた3種ベシクル、すなわち超音波照射によって調製されたSUVおよびLUV状ベシクル、さらにMLV、を取り上げ比較することにする。(Fig. 9参照)。Fig. 9に示すように、これらベシクルの T_m 転移の熱的挙動は明らかに異なる。

Table 1は、Fig. 9から得られた3種ベシクルのゲル-液晶層 (T_m) 転移に伴う熱力学的諸量を示す。これらを基にしてベシクルの熱力学的安定性について考察するが、ここに示されるように、3種ベシクルの転移温度 (t_m)、転移エンタルピー (ΔH) および転移エントロピー (ΔS) は、ベシクルのサイズの増大する順序、すなわち $SUV < LUV < MLV$ の順序でいずれも増大する。転移エンタルピーは液晶相とゲル相との間のエンタルピーの差に相当することから、Table 1の転移エンタルピーの関係は、両相間のエンタルピーの差が $SUV < LUV < MLV$ の順序で増大することを示唆する。3.1.4の項で、転移以下の温度での熱処理が、それ以上の温度での熱処理に比べて極めて効果的であることを述べたが、このことは3種ベシクルのゲル相間でのエンタルピーの差が、液晶相間での差よりも大きいということを示唆する。このことを考慮した上で、Table 1の転移温度 (t_m) および転移エンタルピー (ΔH) の関係を基にして作製したエンタルピー (H) ~ 温度 (t) 曲線の模式図をFig. 10下図に示す。この図において、3種ベシクルの $H \sim t$ 曲線は、転移以下の温度領域で $SUV < LUV < MLV$ の順序で低くなることが示される。

そこで、Fig. 10の $H \sim t$ 曲線の模式図を参照することで、エンタルピー的観点から、ベシクルを構成する脂質分子のゲルおよび液晶相での会合状態を考察する。ゲル相において、脂質分子はそれに連なる炭化水素鎖が固体状態で存在するために、幾何学的条件が許す限り出来るだけ密な会合状態を選択する傾向を有する。このような会合状態をとるためには、MLVのようなサイズが大きい、すなわち表面曲率の低いベシクルの方が有利である。その結果、MLVのゲル相は脂質分子が極めて密に充填した配列状態をとると考えられる。一方、サイズが小さいSUVは表面曲率が高いため、MLV様の会合状態をとることは出来ない^{15,18,19)}。その結果、SUVのゲル相は脂質分子が比較的、疎に充填した配列状態をとらざるを得ないと考えられる。従って、ゲル相においての脂質分

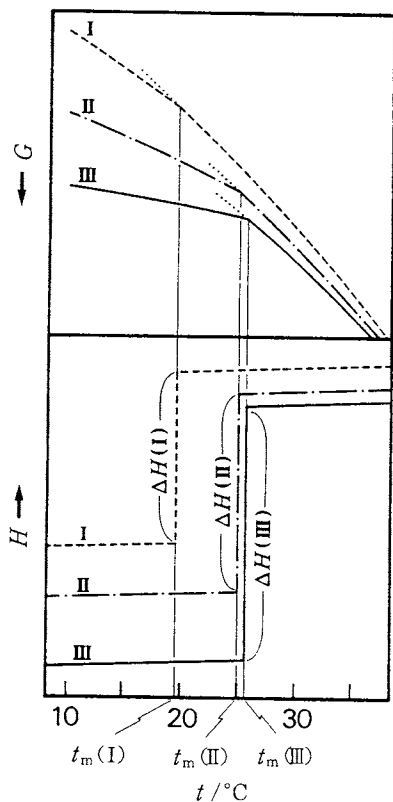


Fig. 10 Relationship between schematic diagrams of $G-t$ (above) and $H-t$ (below) curves of sonicated SUV (I), sonicated LUV-like vesicle (II), and MLV (III) composed of DMPC. t_m represents the temperature of phase transition of gel to liquid crystal. ΔH presents enthalpy change associated with the T_m transition.

子の会合状態はベシクルのサイズ，すなわち表面曲率に依存して大きく異なることが示唆される。

液晶相を眺めると，ここでは脂質分子の炭化水素鎖は液体状態で存在するため，疎に充填した会合状態を選択すると考えられる。従って，液晶相での脂質分子の会合状態は，ゲル相ほどの表面曲率の影響を受けないと考えられる。エンタルピーの観点からゲル相および液晶相を眺めると，脂質分子の充填状態は炭化水素鎖の運動状態と，炭化水素鎖間に働く van der Waals 力に極めて大きな影響を与える^{20,21)}。従って，これら二つがゲルおよび液晶相のエンタルピーを決定する要素であると考えられる。この二つのエンタルピー的要素に着目すると，ゲル相における MLV の密に充填した会合状態は炭化水素鎖の運動状態を低下させ，それと共に鎖間の van der Waals 相互作用を強める。その結果，MLV のゲル相は

他の 2 種のベシクルのゲル相よりもエンタルピー的により低下する。また，同様にして LUV のゲル相の $H-t$ 曲線は，SUV のそれよりもより低くなると考えられる。従って，Fig. 10 の模式図に示すように，3 種ベシクルのゲル相の $H-t$ 曲線は $SUV < LUV < MLV$ の順序で低下すると考えられる。

3 種ベシクルの Gibbs エネルギー (G) ~ 温度 (t) 曲線の模式図を Fig. 10 上図に示すが，この図は上述のエンタルピー効果を考慮し，Table 1 の転移エントロピー (ΔS) および転移温度 (t_m) の関係に基づいて作製された²²⁻²⁴⁾。この図で，3 種ベシクルのゲル相の $G-t$ 曲線は $SUV < LUV < MLV$ の順序で低下することが示される。すなわち，ゲル相でのこの熱力学的安定性の相違に基づいて，SUV の不安定ゲル相は熱処理によって，より安定な状態へと移行すると考えられる。この現象は，脂質分子がより密に充填した会合状態に再配列することで達成されるであろう。この脂質分子の再配列はベシクルの表面を平面形状へと移行させ，これが，SUV が LUV 状のベシクルを経て，最終的には最も表面曲率の低い MLV への移行をもたらすと考えられる。これに対して，本研究において転移以上の温度での熱処理の効果は小さいことを明らかにしている。すなわち，上述したように液晶相での脂質分子はベシクルの表面曲率の影響を受けないで，ほぼ同じ疎に充填した会合状態をとる。その結果，Fig. 10 の $G-t$ 曲線の模式図に示すように，3 種ベシクルの液晶相間での熱力学的安定性の差は小さくなると考えられる。

5. 謝 辞

本研究を行うにあたり，御助言および御協力をいただきました京都大学工学部教授砂本順三先生，同助手秋吉一成先生，佐藤蕃典先生に深く感謝いたします。電子顕微鏡撮影は岡山理科大学・分析センター所属の装置を用いて行なった。同センターの横田康広博士の御協力に感謝致します。

本研究は文部省科学研究補助金 (課題番号: 01470013) によって遂行された。

文 献

- 1) 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三, "リポソーム", 南江堂, (1988).
- 2) A. D. Bangham, M. M. Standish, J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.* **13**, 238 (1965).
- 3) 児玉, 油化学 **39** (No. 8), 530 (1990).
- 4) H. O. Hauser, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**,

- 1049 (1971).
- 5) G. V. Marinetti, *J. Lipid Res.* **3**, 1 (1962).
 - 6) F. Jr. Szoka, D. Papahadjopoulos, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **9**, 467 (1980).
 - 7) C. Huang, *Biochemistry* **8**, 344 (1969).
 - 8) S. M. Johnson, A. D. Bangham, M. W. Hill, E. D. Korn, *Biochim. Biophys. Acta.* **233**, 820 (1971).
 - 9) J. Sunamoto, T. Hamada, H. Murase, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **53**, 2773 (1980).
 - 10) K. Jr. Kinoshita, R. Kataoka, Y. Kimura, O. Gotoh, A. Ikegami, *Biochemistry* **20**, 4270 (1981).
 - 11) M. Kodama, Y. Hashigami, S. Seki, *Biochim. Biophys. Acta* **814**, 300 (1985).
 - 12) M. Kodama, Y. Hashigami, S. Seki, *J. Colloid Interface Sci.* **117**, 497 (1987).
 - 13) S. E. Schullery, C. F. Schmidt, P. Felgner, T. W. Tillack, T. E. Thompson, *Biochemistry* **19**, 3919 (1980).
 - 14) J. Suurkuusk, B. R. Lentz, Y. Barenholz, R. L. Biltonen, T. E. Thompson, *Biochemistry* **15**, 1393 (1976).
 - 15) D. Lichtenberg, E. Freire, C. F. Schmidt, Y. Barenholz, P. L. Felgner, T. E. Thompson, *Biochemistry* **20**, 3462 (1981).
 - 16) J. R. Wiener, R. R. Wagner, E. Freire, *Biochemistry* **22**, 6117 (1983).
 - 17) B. R. Lentz, T. J. Carpenter, D. R. Alford, *Biochemistry* **26**, 5389 (1987).
 - 18) C. Huang, J. T. Mason, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 308 (1978).
 - 19) P. W. M. Van Dijck, B. De Kruijff, P. A. M. M. Aarts, A. J. Verkleij, J. De Gier, *Biochim. Biophys. Acta* **506**, 183 (1978).
 - 20) J. F. Nagle, *J. Chem. Phys.* **58**, 252 (1973).
 - 21) J. F. Nagle, D. A. Wilkinson, *Biophys. J.* **23**, 159 (1978).
 - 22) M. Kodama, K. Tsujii, S. Seki, *J. Phys. Chem.* **94**, 815 (1990).
 - 23) M. Kodama, T. Kunitake, S. Seki, *J. Phys. Chem.* **94**, 1550 (1990).
 - 24) M. Kodama, S. Seki, *Adv. in Colloid Interface Sci.* **35**, 1 (1991).

要 旨

超音波照射に基づく, Dimyristoylphosphatidyl-choline (DMPC) から構成された大きいサイズの多重膜ベシクル (MLV) の, 小さいサイズの一重膜ベシクル (SUV) への移行過程を示差走査熱量測定によって検討した。そこでは, 最終段階の SUV が, 中間過程で出現する大きいサイズの一重膜状ベシクルを経て達成されることを明らかにした。また, 本研究で得られた, サイズ及び膜の多重性の異なる代表的 3 種ベシクル, すなわち超音波照射によって作製された SUV および大きいサイズの一重膜状ベシクル, さらに MLV, のゲル-液晶相転移 (T_m 転移) の熱的挙動は明らかに異なることが示された。これら 3 種ベシクルの T_m 転移に基づくエンタルピーおよびエントロピー変化量, そして転移温度はベシクルのサイズが増大する順序, すなわち SUV < 大きいサイズの一重膜状ベシクル < MLV の順序でいずれも増大した。さらに, $\sim -5^\circ\text{C}$ 温度での熱処理によって, SUV は大きいサイズの一重膜状ベシクルを経て, 最終的には多重膜構造のベシクルへと移行した。3 種ベシクルの熱力学的諸量に基づいて作製した Gibbs エネルギー (G) ~ 温度 (T) 曲線は, エンタルピー (H) ~ 温度 (T) 曲線と同様に, ゲル相において, SUV < 大きいサイズの一重膜状ベシクル < MLV の順序で低下することが示された。以上の結果から, DMPC ベシクルは, 脂質分子がより密に会合することから生じるエンタルピー効果によって, 熱力学的により安定化することを示唆する。