


 解説

リン脂質二分子膜相転移の熱力学

松木 均, 金品昌志

(受取日: 2006年1月30日, 受理日: 2006年2月24日)

Thermodynamics of Bilayer Phase Transitions of Phospholipids

Hitoshi Matsuki and Shoji Kaneshina

(Received January 30, 2006; Accepted February 24, 2006)

Phospholipid bilayer membranes undergo various phase transitions depending on environmental factors such as temperature, pressure, salt concentration and so on. Although the differential scanning calorimetry (DSC) is especially effective in detecting the bilayer phase transitions, combination of the thermal information with results obtained from pressure measurements enables us to deepen a thermodynamic understanding of the bilayer transitions. Phase transitions of bilayer membranes formed by phospholipids, which are frequently used in studies of biological membranes, were explained and phase transition measurements under high pressure were introduced. Next the bilayer phase transitions for phosphatidylethanolamine homologues with different kinds of hydrophobic chains (degree of unsaturation in acyl chains) and different-sized polar head groups were taken up and the bilayer phase transitions were thermodynamically characterized in terms of pressure dependence of phase-transition temperatures, temperature-pressure phase diagrams and thermodynamic quantity changes associated with phase transitions.

1. はじめに

生物の構成単位である細胞は細胞膜により外部と隔離されている。細胞膜の主構成成分はリン脂質であり、リン脂質を水中に分散すると自発的に自己組織化し、ベシクルあるいはリポソームと呼ばれる二分子膜構造の閉鎖型小胞体を構築する。このため、リン脂質二分子膜構造体は生体膜モデル系として幅広く利用されている。脂質二分子膜の最も大きな特徴は、その周囲の環境変化(温度、圧力、塩濃度、溶媒置換など)に鋭敏に応答し、その集合体構造を変化させ相転移を起こすことである。脂質二分子膜相転移の検出は様々な物理化学的手法で行われているが、中でも特に有効なのは示差走査熱量(DSC)測定である。^{1,2)} これま

で多数のリン脂質が形成する二分子膜の相転移がDSC測定により調べられ、脂質二分子膜の温度感受性が明らかにされている。他方、温度と並んで重要な熱力学変数に圧力がある。近年、麻酔作用の圧拮抗、深海生物の高圧力環境適応、食品加工における高圧力殺菌などのような圧力変化による膜物性変化への注目が高まってきている^{3,4)}が、これまで圧力を変数として脂質二分子膜の状態を解析した研究は非常に少ない。

脂質二分子膜の圧力感受性を調べ、温度感受性と組み合わせることにより、以下のことが可能となる。^{5,6)} (1) DSC測定から得られる相転移温度および相転移に伴う熱力学量変化(相転移エンタルピーおよび相転移エントロピー)に相転移圧力、相転移温度の圧力依存性および相転移に伴う

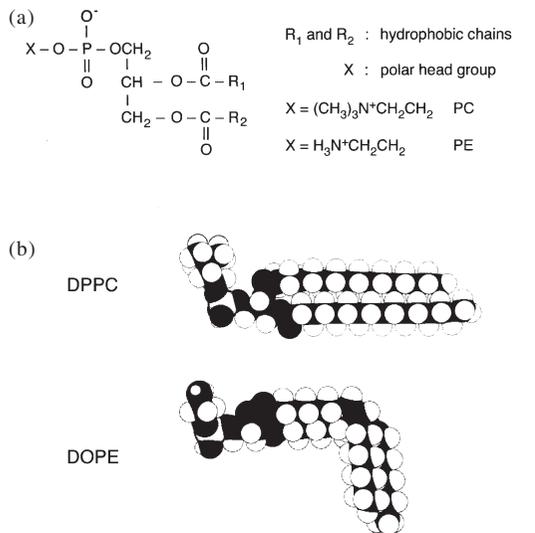


Fig.1 (a) Structural formula of glycerophospholipids. (b) Molecular structures of DPPC and DOPE.

体積変化（相転移体積）を加えることができるので、相転移の熱力学的研究の洗練度を高められる。(2) 相転移現象を温度軸に加えて、圧力軸にも関係づけられ、脂質膜相転移に関する温度-圧力相図を構築できる。得られた相図を用いると相の安定性、相の共存状態および相の多形現象などの相挙動を二次元の領域に捉えることが可能となる。さらに脂質二分子膜相転移温度は加圧により上昇するので、(3) 溶媒凝固により DSC 測定では検出不能な低温相転移が高圧下においては検出可能となる。生体膜中には不飽和脂肪酸を含む不飽和リン脂質を数多く含む。一般に不飽和脂肪酸は低融点を有することに対応し、不飽和リン脂質の相転移温度は0℃近傍やそれ以下のものが多い。高压研究は不飽和リン脂質の相転移検出には極めて有効である。^{7,8)} 本稿では、疎水鎖および親水頭部の構造が異なるリン脂質が形成する二分子膜の相転移を温度に加えて圧力の関数として測定することで得られた熱力学的な知見を紹介する。

2. リン脂質二分子膜の相転移

生体膜中に含まれている脂質は、グリセリン脂質、スフィンゴリン脂質、糖脂質、コレステロールなど様々な種類が存在する。我々が研究対象としているのは生体膜脂質の大部分を占めるグリセリン脂質である。グリセリン脂質の構造式を Fig.1(a) に示す。グリセリン脂質はグリセロールを基本骨格にし、2種類の脂肪酸と種々の極性基を有するリン酸が脱水結合した構造をとる。脂肪酸とリン酸に結合する極性基の組み合わせにより、様々なグリセリン脂質が存在するが、赤血球膜など実際の細胞膜に含ま

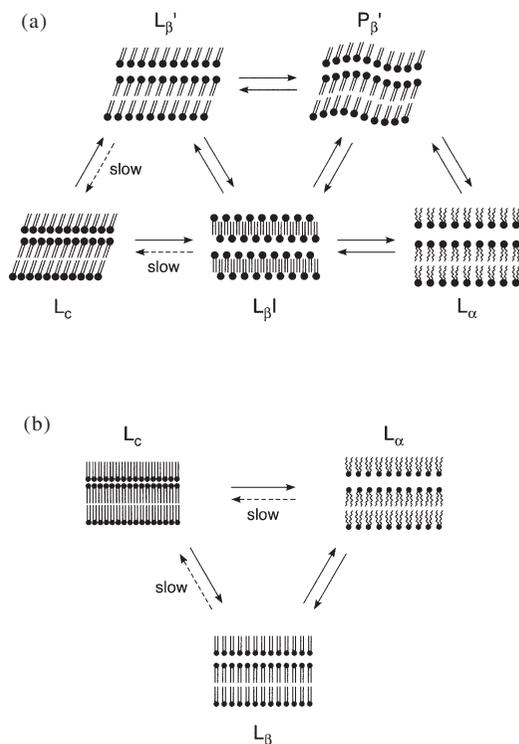


Fig.2 Schematic representation for the structures of phospholipid bilayer membranes: (a) DPPC, (b) DPPE.

れる主要脂質は極性基がコリン基およびエタノールアミン基であるジアシルホスファチジルコリン (PC) およびジアシルホスファチジルエタノールアミン (PE) である。このため、両リン脂質がモデル膜研究に繁用されている。特に炭素鎖長14や16の飽和脂肪酸であるミスチン酸やパルミチン酸をアシル鎖に有し、二つの脂肪酸が同じである飽和対称リン脂質のPCやPEはゲル-液晶間の相転移温度が常温付近に存在するため、脂質二分子膜の物理化学研究における格好の対象脂質となっている。Fig.1(b)に本稿において対象とした飽和PCおよび不飽和PE脂質のゲル相における立体構造の一例を示した。

ジパルミトイル・PC (DPPC) およびジパルミトイル・PE (DPPE) が形成する二分子膜の相状態と相転移を Fig.2 に挙げる。常圧下、通常DPPC二分子膜において観測される相状態は、ラメラ結晶 (L_C) 相、ラメラゲル (L_{β}') 相、リップルゲル (P_{β}') 相および液晶 (L_{α}) 相の4種類であり、⁹⁻¹¹⁾ 低温から順に起こる L_C/L_{β}' 、 L_{β}'/P_{β}' および P_{β}'/L_{α} の転移をそれぞれ副転移、前転移および主転移と呼んでいる。低温状態における最安定相の L_C 相は、その相が DPPC 二分子膜に

対して見出された歴史的背景からサブゲル相とも呼ばれる。加えてDPPC二分子膜は高圧下¹²⁾や両親媒性物質存在下¹³⁾において、非二分子膜構造の一種である指組み構造ゲル(L_βI)相へ転移する。L_c相, L_β'相, P_β'相およびL_βI相においては脂質の疎水鎖はすべてトランス型でまっすぐ伸びた秩序性の高い膜である。L_c相からL_β'相への副転移は脂質分子の極性基間や二分子層間にある水(凍結および不凍結層間水)の状態変化により引き起こされる。脂質二分子膜を完全にL_c相に移行させるためには低温で長時間保存しなければならず、特にPC二分子膜ではアニーリングなどの水和状態を変化させるための前処理¹⁴⁾が必要とされる。L_β'相, P_β'相およびL_βI相はPC二分子膜の特徴でもあるゲル相での多形現象である。PC分子はその大きな極性コリン基の立体障害のため、ゲル相では鎖が二分子膜面に対して垂直配向した場合には疎水基間の十分な接近距離を保つことができないので、膜面より約30度傾斜することにより疎水鎖間のファンデルワールス力を強め安定距離が保たれている。L_β'相からP_β'相への前転移ではアシル鎖は伸び切った状態のままで親水基部分のパッキングに変化が現れ、二分子膜が平面ゲル相から波型のリップル相に転移する。L_βI相は二分子膜を構成する一方の膜の脂質炭化水素鎖が他方の膜の炭化水素鎖中へ侵入した構造をとる。P_β'相からL_α相への主転移はアシル鎖の融解現象に対応し、L_α相では疎水鎖の配置に回転異性体のゴーシュ型が増し、鎖はゆらぎ秩序性の低い膜となり膜の流動性が増加する。

他方、DPPE二分子膜で観測される相状態はL_c相, アシル鎖が二分子膜面に対して傾斜配向していないラメラゲル(L_β)相およびL_α相の3種類である。^{15,16)} また、4種類の相全てが安定相として存在するDPPC二分子膜とは異なり、常圧ではL_β相は準安定相である。そのため熱履歴に依存して、L_c相からゲル相を経ずに直接L_α相に移行するL_c/L_α転移および主(L_β/L_α)転移が観測される。PEのように親水基頭部が小さくなると、親水基間の立体障害が減少するため疎水鎖の充填は密となり、二分子膜面に対して垂直に配向することが可能となる。このため、PE脂質では鎖の傾斜が起こらず、ゲル相間転移は観測されなくなる。さらにPE脂質では極性基間の水が脱水和しやすく、PC脂質に比べて容易にL_c相を形成する。なお、ここでは相間の混同を避けるために明らかな場合を除き単に副転移や主転移として呼ぶことはせず、L_c/L_β転移やP_β'/L_α転移と相状態を明記する。

3. 常圧下および高圧下における相転移観測

常圧下におけるリン脂質二分子膜の相転移検出にはDSC法が最も広く使用されており、我々も常圧下の相転移観測にDSC法を利用している。近年は高感度DSC装置の普及により、脂質の低濃度においても前転移のような微小な転

移を精度良く検出することが可能である。しかしながら、高圧力下においては圧力一定の条件下での温度走査の困難さのためか、現在まで高圧DSC装置はほとんど開発されていない。一方、ベシクル懸濁液に光をあてると、ベシクル粒子にあたった光は散乱されて透過光は減少する。相転移により、主として膜の光学的性質(屈折率)が変わるためにベシクル懸濁液の濁度が変化する。濁度変化は分光光度計を用いて光透過率(あるいは吸光度)の変化として正確にとらえることができるので、ベシクル懸濁液の光透過率測定は相転移検出に利用できる。我々は高圧力下における脂質二分子膜の相転移検出に市販の分光光度計に高圧分光セルを据え付けた装置による高圧光透過法^{17,18)}を採用している。DSC法のような相転移検出法は低脂質濃度の条件下よりも高脂質濃度の方が精度良く測定できるが、光透過法ではむしろ低脂質濃度の条件下において相転移検出に有利であることが判明している。高圧力下における相転移検出は、一定圧力下で温度走査による光透過率変化から相転移を検出する方法(isobaric thermotropic transition)および一定温度下で圧力走査により相転移を検出する方法(isothermal barotropic transition)の2種類の方法を併用して行っている。圧力一定下における昇温および降温過程は温度一定下における減圧および加圧過程に相応するので、両者による観測は転移の可逆性や温度・圧力履歴を判別するのに役立つ。

4. リン脂質二分子膜の高圧相挙動

前述したDPPCおよびDPPE二分子膜の膜状態から明らかのように、極性基の僅かな相違が相挙動に大きな影響を与える。コリン基とエタノールアミン基の分子構造の相違は極性基内の窒素原子に結合したメチル基の数(コリン(すなわちトリメチルエタノールアミン)では3, エタノールアミンでは0)である。飽和アシル鎖を有し、エタノールアミン基からコリン基へと逐次メチル基の数を段階的に増やしたN-メチル化飽和PEおよび不飽和アシル鎖を有するN-メチル化不飽和PEが形成する二分子膜の相転移測定から得られた結果をもとに、疎水鎖種類(アシル鎖の不飽和度)および極性基サイズの相違が脂質二分子膜相転移におよぼす影響^{19,20)}を以下に述べる。

4.1 N-メチル化飽和ホスファチジルエタノールアミン

Fig.3にDPPEのエタノールアミン基を逐次メチル化したリン脂質、DPPE、ジパルミトイル(・モノメチルPE(DPMePE), ・ジメチルPE(DPMe₂PE))およびDPPCのベシクル水溶液に対して得られた昇温過程におけるDSCサーモグラムを示す。サーモグラムからこれら4種類のリン脂質は複数の種類の相転移を示し、各相転移温度は極性基

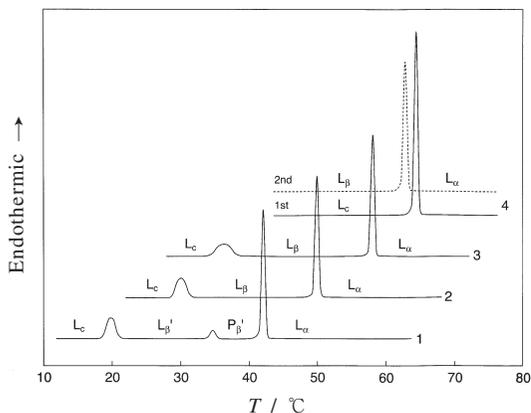


Fig.3 DSC heating thermograms for solutions of *N*-methylated DPPE bilayer membranes: (1) DPPC, (2) DPM_{e2}PE, (3) DPM_ePE, (4) DPPE.

サイズの増加に伴いより低温側に移行した。DPPC二分子膜では副転移、前転移および主転移に対応した三つの転移が観測されたが、DPM_{e2}PEおよびDPM_ePE二分子膜ではゲル相間転移は観測されず、副(L_c/L_β)転移と主(L_β/L_α)転移の二つの転移のみを観測した。DPPE二分子膜のDSCサーモグラムには一つの吸熱ピークしか現れなかったが、昇温の熱履歴が異なり、1度目に昇温した場合と同じ試料を再度(2度目)に昇温した場合に得られるピーク温度の位置やピーク面積が異なった。1度目の昇温過程の転移はL_c/L_α転移に、2度目の昇温過程の転移はL_β/L_α転移に対応している。この熱履歴はFig.2(b)に示してあるようにDPPE二分子膜のL_α相は常温下ではL_c相へ転移するのに時間を要し、L_β相が準安定相として出現することに起因する。

高圧下における相転移測定の結果をDSC測定の結果と組み合わせ、これら4種類のリン脂質の温度(T)-圧力(p)相図を構築した。¹⁹⁾ 結果をFig.4に示す。加圧により、いずれのリン脂質においても各相転移温度は上昇したが、

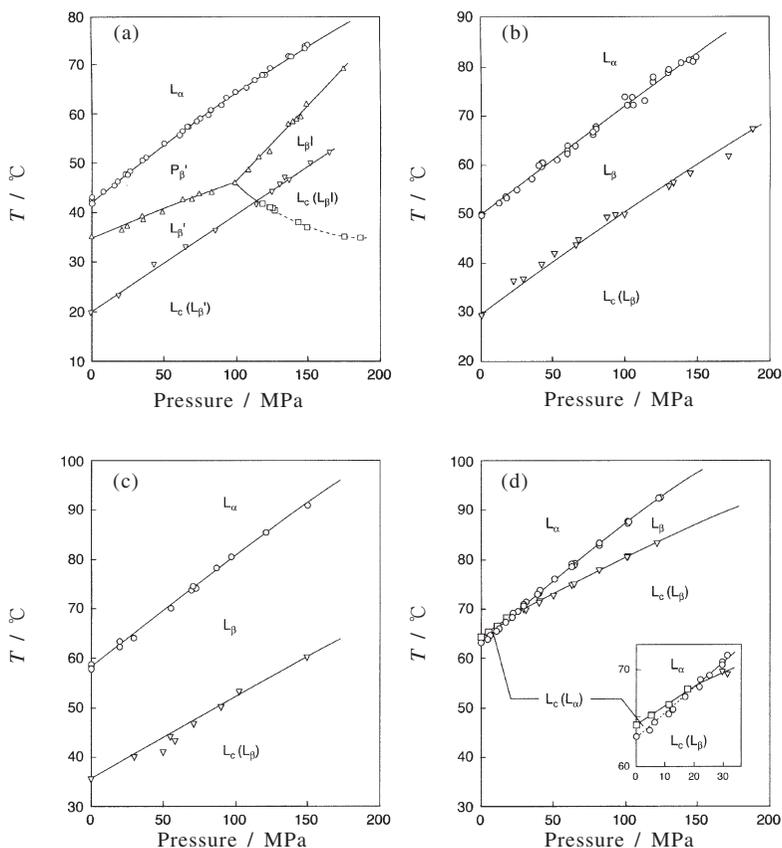


Fig.4 Temperature-pressure phase diagrams of *N*-methylated DPPE bilayer membranes: (a) DPPC, (b) DPM_{e2}PE, (c) DPM_ePE, (d) DPPE. Bilayer phases are assigned as lamellar crystal (L_c), lamellar gel (L_β or L_β¹), ripple gel (P_β¹) and liquid crystal (L_α). Bilayer phase in parentheses refers to the metastable phase.

Table 1 Thermodynamic properties for the phase transitions of *N*-methylated DPPE bilayer membranes.

Lipid	Transition	T / K	$T / ^\circ C$	$(dT/dp) / K MPa^{-1}$	$\Delta H / kJ mol^{-1}$	$\Delta S / J K^{-1} mol^{-1}$	$\Delta V / cm^3 mol^{-1}$
DPPC	$L_c/L_{\beta'}$	293.6	20.4	0.180	22.5	77	13.9
	$L_{\beta'}/P_{\beta'}$	309.0	35.8	0.130	5.4	17	2.2
	$P_{\beta'}/L_{\alpha}$	314.8	41.6	0.220	36.4	116	25.2
DPM ₂ PE	L_c/L_{β}	302.6	29.4	0.170	24.5	81	13.8
	L_{β}/L_{α}	322.4	49.2	0.230	36.8	114	26.2
DPM _e PE	L_c/L_{β}	308.7	35.5	0.160	25.4	82	13.1
	L_{β}/L_{α}	331.2	58.0	0.246	35.6	107	26.4
DPPE	L_c/L_{α}	337.5	64.3	0.230	74.3	220	50.6
	L_{β}/L_{α}	336.3	63.1	0.264	34.7	103	27.2
	L_c/L_{β}	—	—	0.160	—	—	—

DPM₂PE およびDPM_ePE 二分子膜に対して観測された単純な相挙動に比べ、DPPC およびDPPE 二分子膜は複雑な相挙動を示した。DPPC 二分子膜は100 MPa 以上の高圧領域においてL_βI 相に転移し、高圧力下でその領域を拡大した。また高圧下において観測したL_β'相からL_βI 相への相境界の勾配は全脂質の相図中で唯一負となり、これは後述するクラペイロンの式から予想されるようにL_β'相からL_βI 相への体積変化が負値^{18,21)}であることに対応する。したがって、L_c/L_β'転移曲線とL_β/L_βI 曲線は約115 MPa で交差するのが見られ、この圧力以上ではL_β/L_βI 転移は準安定相間の転移であると同定した。DPPC、DPM₂PE およびDPM_ePE 二分子膜においては全圧力範囲において副(L_c/L_β'あるいはL_c/L_β) 転移曲線が主(P_β'/L_αあるいはL_β/L_α) 転移曲線よりも低温側に位置し、これらのリン脂質のゲル相は相図上で全て安定相として出現した。これに対してDPPE 二分子膜では、L_c/L_β 転移曲線とL_β/L_α 曲線が21.8 MPa で交差し、交差点前後の圧力範囲においてゲル相の安定性が異なった。常圧から21.8 MPa 以下の低圧領域ではL_β/L_α 転移よりも高温でL_c/L_α 転移が出現し、この低圧力範囲ではL_β 相は準安定相として存在した。一方、21.8 MPa 以上の高圧領域においては、L_c/L_β 転移およびL_β/L_α 転移の二つの連続した相転移を観測し、DPPE 二分子膜では高圧力領域においてのみL_β 相が安定相として出現することがわかった。さらにゲル相の多形現象は高圧力下でも常圧下と同様にDPPC 二分子膜においてのみ観測され、特にL_βI 相への転移は200 MPa の高圧力下においても他の脂質二分子膜には観測されなかった。上記の結果はゲル相の多形には、膜面に対して疎水鎖が傾斜配向する程大きな極性基を脂質分子が持つことが必須であることを示している。

N-メチル化飽和PE 脂質に対して決定された二分子膜相転移の熱力学諸量をTable 1 にまとめた。ここで、エンタルピー変化(ΔH) およびエントロピー変化($\Delta S = \Delta H/T$)

はDSC 測定から求め、体積変化(ΔV) は相転移温度の圧力依存性(dT/dp) にクラペイロンの式($dT/dp = \Delta V/\Delta S$) を適用して算出した。 dT/dp 値は極性基のメチル化度に依存して、副(L_c/L_β'あるいはL_c/L_β) 転移に関して0.160~0.180 K MPa⁻¹、主(P_β'/L_αあるいはL_β/L_α) 転移に関して0.220~0.264 K MPa⁻¹の範囲となり、転移の種類に依存して異なる数値群となった。相転移に伴う熱力学量変化は全ての脂質二分子膜の主転移およびDPPE 二分子膜以外の副転移については親水基による影響がほとんど現れずに類似値をとった。*N*-メチル化飽和PE 脂質は全て同じパルミチン鎖を有するため、同疎水鎖の*trans-gauche* 変化による主転移はほぼ同程度の熱力学量の変化をもたらすと考えられる。DPPC、DPM₂PE およびDPM_ePE 二分子膜の同様な副転移の熱力学量変化は、これら脂質二分子膜のL_c 相は互いに熱力学的に類似した状態にあることを示唆している。両相転移の熱力学量変化の類似性とは対照的に、両転移温度は極性基サイズ増加と共に段階的に減少し、脂質間で顕著な相違が生じた。アシル鎖が二分子膜面に傾斜配向するDPPC とは異なり、DPPE では膜面に垂直配向し、エタノールアミン基の窒素原子と隣り合うPE 脂質のリン酸基間に分子間水素結合を形成する²²⁾ことが知られている。DPPE の極性基間に働くより強い引力的相互作用は二分子膜の横方向への拡張を妨げ、相転移温度の上昇をもたらすものと推察される。極性基中のメチル基の数の増加に伴い、分子断面積や鎖間距離は増大するので、極性基サイズ増加と共に段階的な減少を観測した両転移温度は、これらリン脂質の*N*-メチル化した極性基間の異なった水素結合能に基づくものと考えられる。DPPE 二分子膜においてL_c/L_β 転移の ΔH 値をL_c/L_α 転移とL_β/L_α 転移の差から求めてみると、その値は約40 kJ mol⁻¹となり、他の脂質のもの(24 kJ mol⁻¹) に比べて1.7 倍程大きい。この事実は*N*-メチル化飽和PE 脂質のうちDPPE はその強い極性基間相互作用のため、エネ

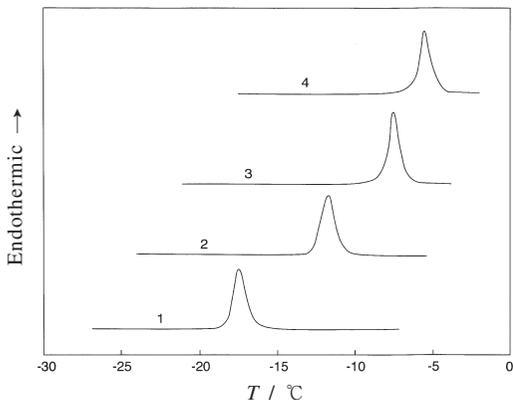


Fig.5 DSC heating thermograms for solutions of *N*-methylated DOPE bilayer membranes: (1) DOPC, (2) DOME₂PE, (3) DOMEPE, (4) DOPE.

ルギーレベルが低い最も安定なL_c相を形成することを表しており、PE脂質のL_c相における層間領域に層間水がほとんど無いこと^{16,22)}によく対応している。(後述)

4.2 *N*-メチル化不飽和ホスファチジルエタノールアミン

ゲル-液晶相転移を低温に有する不飽和リン脂質は生体膜の流動性制御には不可欠である。炭素鎖長18でcis二重結合を9位に有するオレイン酸を疎水鎖として持ち、極性基サイズの異なる4種類の*N*-メチル化不飽和PE (ジオレオイル・PE (DOPE), ・モノメチルPE (DOMEPE), ・ジメチルPE (DOME₂PE), ・PC (DOPC)) ベシクル水溶液の昇温過程におけるDSCサーモグラムをFig.5に示す。*N*-メチル化飽和PE二分子膜とは異なり、*N*-メチル化不飽和PE二分子膜ではいずれの場合も0℃以下の低温において一つの相転移のみを観測し、極性基サイズの増加に伴い、相転移温度はより低温に移行した。これまでにDOPEやDOPCの相転移をDSC測定で観測した報告例は幾つかあり、それらは全てこの吸熱ピークをL_β相からL_α相への主転移であると見なしている。^{23,24)}

Fig.6に4種類の*N*-メチル化不飽和PE二分子膜に対して得られた*T-p*相図をまとめて示す。²⁰⁾ 全てのPE二分子膜は高圧力下においても常圧下同様にただ1種類の転移のみを示し、相転移温度は圧力の増加と共に直線的に増加した。DOPE, DOMEPEおよびDOME₂PEに対して得られた相転移曲線の常圧下への外挿値はDSC測定から得られた結果とそれぞれ一致した。これに対して、DOPC二分子膜に対して得られた相転移曲線のd*T*/d*p*値は他の脂質のものとは異なり、それ故常圧下への外挿値がDSC測定の結果と一致しなかった。そこで、DOPC二分子膜の相転移を詳しく検討

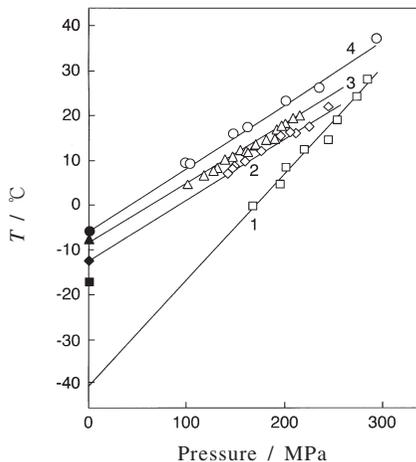


Fig.6 Temperature-pressure phase diagrams of *N*-methylated DOPE bilayer membranes: (1) DOPC, (2) DOME₂PE, (3) DOMEPE, (4) DOPE. Closed symbols correspond to the results obtained from DSC measurements.

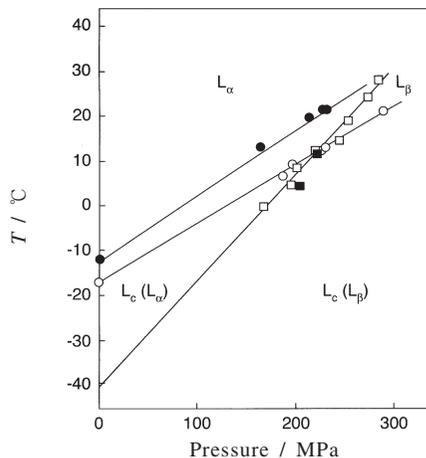


Fig.7 Temperature-pressure phase diagrams of DOPE bilayer membrane. Closed and open symbols indicate the results in aqueous 50 % ethyleneglycol solution and in water, respectively. Bilayer phases are assigned as lamellar crystal (L_c), lamellar gel (L_β) and liquid crystal (L_α). Bilayer phase in parentheses refers to the metastable phase.

してみた。

我々が以前に行った50 % エチレングリコール水溶液中におけるDOPC二分子膜の*T-p*相図²⁵⁾をFig.7に示す。エチレングリコール水溶液中では高圧力下においてDOPC二

Table 2 Thermodynamic properties for the phase transitions of *N*-methylated DOPE bilayer membranes.

Lipid	Transition	T / K	$T / ^\circ C$	$(dT/dp) / K MPa^{-1}$	$\Delta H / kJ mol^{-1}$	$\Delta S / J K^{-1} mol^{-1}$	$\Delta V / cm^3 mol^{-1}$
DOPC	L_c/L_α	256.0	-17.2	0.131	29.4	115	15.1
	$L_c/L_\alpha^a)$	261.1	-12.1	0.147	52.9	203	29.8
	L_β/L_α	232.9	-40.3	0.233	-	-	-
DOMe ₂ PE	L_c/L_α	260.9	-12.3	0.138	31.6	121	16.7
DOMePE	L_c/L_α	265.7	-7.2	0.127	29.8	112	14.2
DOPE	L_c/L_α	267.7	-5.5	0.145	28.0	105	15.2

a) The values obtained in aqueous 50 % ethylene glycol solution.

子膜に2種類の相転移を観測した。エチレングリコールは脱水和能を有することを考慮し、2種類の相転移の出現様式を調べた結果、高温側の相転移は L_c 相から L_α 相への相転移であり、低温側の相転移は L_β 相から L_α 相への主転移であると同一化した。すなわち、測定した全圧力範囲で L_β 相は準安定相であった。また L_c/L_α 転移の常圧下への外挿値は50 %エチレングリコール中においてLewisらによりDSC測定で検出された相転移温度²⁶⁾と良い一致を示した。このデータに先程の水中において得られた高圧データをプロットしてみると L_β/L_α 転移曲線上に重なり、Fig.6に示したDOPC二分子膜の高圧相転移は L_β/L_α 転移である可能性が示唆された。我々は最近、水中のDOPC二分子膜試料を200 MPa以上の加圧下において数日間放置させた後に高圧実験を行い、水中におけるDOPC二分子膜の L_c/L_α 転移を検出することに成功した。²⁰⁾ 得られた L_c/L_α 転移をFig.7中にプロットした。水中における L_c/L_α 転移曲線は50 %エチレングリコール中におけるものよりも下側に位置し、そのため L_c/L_α 転移曲線は L_β/L_α 転移曲線と234 MPaにおいて交差した。この結果は先に示したDPPE二分子膜の相挙動と定性的に類似し、DOPC二分子膜では常圧から234 MPaまでの圧力範囲では L_β は準安定相で存在し、234 MPa以上で安定相に転移することが明らかとなった。さらに水中における L_c/L_α 転移曲線の常圧下への外挿値はFig.6に挙げたDSC測定の結果とほぼ一致した。

Table 2に4種類の*N*-メチル化不飽和PE二分子膜に対して得られた相転移に伴う熱力学量変化を挙げる。DOPE, DOMePEおよびDOMe₂PE二分子膜に対して得られた dT/dp 値(0.127~0.145 K MPa⁻¹)は、DOPC二分子膜の L_β/L_α 転移(0.233 K MPa⁻¹)よりはむしろ L_c/L_α 転移(0.131 K MPa⁻¹)に近く、これら3種類のリン脂質の相転移に伴う熱力学量変化はDOPC二分子膜の L_c/L_α 転移にほぼ匹敵していた。さらに3種類のリン脂質の相転移温度とDOPC二分子膜の L_c/L_α 転移温度は極性基サイズの増加につれ段階的に減少した。上記の結果を*N*-メチル化飽和PE二分子膜で得られた結果¹⁹⁾と考え合わせると、*N*-メチル化不飽和

PE二分子膜が常圧下で示す相転移は従来言われていた主(L_β/L_α)転移^{23,24)}ではなく、 L_c 相から L_α 相の転移であると結論づけた。4種類の*N*-メチル化不飽和PE二分子膜の L_c/L_α 転移の熱力学量変化がほぼ等しく、 L_c/L_α 転移温度が段階的に変化する事実は*N*-メチル化飽和PE二分子膜で得られた結論と同様に、同じオレオイル鎖を有するこれら脂質はほぼ同様な L_c/L_α 転移を起こすが、極性基間の水素結合能には差異があることを示唆する。DPPE二分子膜は常圧で L_c/L_α 転移を観測可能なため唯一熱力学量変化をDOPE二分子膜と比較でき、飽和-不飽和鎖の影響を考察しうる。DOPE二分子膜の熱力学量変化はDPPE二分子膜のものに比べて半分以下である。オレオイル鎖は*cis*二重結合を有するため L_c 相ではトランス型で屈曲した分子構造をとる。この屈曲構造が鎖間のファンデルワールス相互作用を弱め、脂質分子面積を広げる。 L_c 相におけるこの秩序性の低下がDPPE二分子膜に比べて小さな熱力学量変化をDOPE二分子膜にもたらすと考えられる。^{8,25)}

N-メチル化不飽和PE二分子膜の相転移は常圧下では全て水の凝固点0℃以下の低温で起こる。0℃以下の低温度領域ではバルク水は完全に凍結し、脂質分子間の水素結合が強められる。一方、脂質分子の極性基に結合している水(層間水)はアニーリング処理しなくても結合がゆるみ外れやすくなる。結果として、常圧下では L_c 相に落ち込み易く、 L_β 相は不安定相あるいは準安定相になると推測される。DOPC二分子膜の高圧力下における安定 L_β 相の出現については、DOPC分子の極性基間にある水の結合様式の変化に密接に関係していると思われる。児玉らは精密なDSC測定からPCやPE二分子膜の副(L_c/L_β' あるいは L_c/L_β)転移における層間水の変化を明らかにしている。^{14,16,22,27)} 彼女らによれば、極性基の小さなDMPEなどは L_β 相で約6分子の層間水が L_c 相では1分子に減少するが、極性基の大きなDPPCなどでは層間水の数(約10個程度)こそ変化しないが、 L_β' 相においてはゆるく結合していた水が L_c 相ではさらにゆるく結合した状態へと結合様式が変化する。PC脂質はかなり層間水を有する脂質であることは、エチレングリコールの

ような脱水剤中で L_c 相に転移し易い事実と一致する。上記の議論が不飽和リン脂質に当てはまるかという問題はあがあるが、DOPC二分子膜では L_c 相においてもゆるく結合した層間水を多数有しており、加圧により極性基と水分子間の相互作用が強められ、その結果として L_β 相が高圧力下で安定相として出現するものと考えられる。他の N -メチル化不飽和PE二分子膜において極性基と水分子間の相互作用が強められる加圧下においても L_c/L_α 転移しか観測できない事実は、常圧下でこれら脂質に対してこれまで観測された相転移は全て L_c/L_α 転移であることを示している。

5. おわりに

リン脂質二分子膜相転移を温度軸に圧力軸を加えて熱力学的観点から眺めてみると、相転移の種類に依存して dT/dp 値は異なり、構築した T - p 相図からリン脂質の分子構造と二分子膜相挙動との相関が見えてくる。DPPCやDPPE二分子膜は極性基サイズがそれらの中間程度のDPMcPEやDPMc₂PE二分子膜が与える単純な相図に比べて複雑な相図を与える。DPPCではその大きな極性基のためゲル相中でアシル鎖が傾斜配向し、ゲル相は多形を示す。他方、DPPEの小さな極性基は極性基間の相互作用を強め、圧力に依存してゲル相の安定性を変化させる。一般に生体膜研究によく用いられているDPPCやDPPEは極性基間の分子間相互作用という点では対極にあり、 T - p 相図からは両者が特殊な部類のリン脂質であることが浮かび上がってくる。また、不飽和アシル鎖と大きな極性基を有するDOPCと飽和アシル鎖と小さな極性基を有するDPPEの分子構造上での差異は極めて大きく、分子間相互作用という点からはDOPC二分子膜中における脂質分子間相互作用はDPPE二分子膜中のものに比べて非常に弱いと推察される。しかし、 T - p 相図から両者を比較してみると相図の形が定性的に類似しており、高圧力下においてのみゲル相が安定相として存在するという共通点が存在する。この結果は、温度および圧力に依存して不飽和リン脂質が飽和リン脂質に類似した挙動をとりうることを示しており、高温・高圧のような極限環境下における生物の細胞膜には不飽和リン脂質が多く含まれる事実と照らし合わせてみると、多様なリン脂質の存在意義や生物の環境適応性への関連を伺わせる。

これまでに数多くのリン脂質二分子膜相転移に関する熱的データが蓄積されている。分子構造が系統的に異なるリン脂質の相転移に関する圧力データを収集し、熱的データと併せて検討することで脂質分子構造と二分子膜相状態の統一的な解釈が可能になり、圧力変化による膜物性変化の解明につながるものと期待される。

文 献

- 1) 寺田 弘, 吉村哲郎編著, ライフサイエンスにおけるリポソーム 実験マニュアル, p.128, シュプリンガー・フェアラーク東京 (2000).
- 2) 秋吉一成, 辻井 薫監修, リポソーム応用の新展開 人工細胞の開発に向けて, p.69, エヌ・ティー・エス (2005).
- 3) R. Hayashi, Ed., "Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology", Elsevier, Amsterdam (2002).
- 4) R. Winter, Ed., "Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II", Springer-Verlag, Heidelberg (2003).
- 5) 金品昌志, 松木 均, 一森勇人, 高圧力の科学と技術 **9**, 213 (1999).
- 6) 金品昌志, 松木 均, 生物物理 **40**, 94 (2000).
- 7) D. J. Siminovitch, P. T. T. Wong, and H. H. Mantsch, *Biochemistry* **26**, 3277 (1987).
- 8) H. Ichimori, T. Hata, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Chem. Phys. Lipids* **100**, 151 (1999).
- 9) B. Technov, H. Yao, and I. Hatta, *Biophys. J.* **56**, 757 (1989).
- 10) 八田一郎, 生体膜のダイナミクス, 八田一郎, 村田昌之編集, p.7, 共立出版 (2000).
- 11) R. N. A. H. Lewis and R. N. McElhaney, in "The Structure of Biological Membranes", P. L. Yeagel, Ed., p.57, CRC Press (2004).
- 12) L. F. Braganza and D. L. Worcester, *Biochemistry* **25**, 2591 (1986).
- 13) E. S. Rowe and J. M. Campion, *Biophys. J.* **67**, 1888 (1994).
- 14) M. Kodama, H. Hashigami, and S. Seki, *J. Colloid Interface Sci.* **117**, 497 (1987).
- 15) H. Yao, I. Hatta, R. Koynova, and B. Techov, *Biophys. J.* **61**, 683 (1992).
- 16) M. Kodama, H. Kato, and H. Aoki, *Thermochim. Acta* **352-353**, 213 (2000).
- 17) S. Maruyama, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Chem. Phys. Lipids* **82**, 125 (1996).
- 18) H. Ichimori, T. Hata, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Biochim. Biophys. Acta* **1414**, 165 (1998).
- 19) M. Kusube, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Biochim. Biophys. Acta* **1668**, 25 (2005).
- 20) M. Kusube, M. Goto, N. Tamai, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Chem. Phys. Lipids*, in press (2006).
- 21) K. Ohki, K. Tamura, and I. Hatta, *Biochim. Biophys. Acta* **1028**, 215 (1990).
- 22) M. Kodama, H. Inoue, and Y. Tsuchida, *Thermochim. Acta* **266**, 373 (1995).

- 23) S. M. Gruner, M. W. Tate, G. L. Kirk, P. T. C. So, D. C. Turner, D. T. Keane, C. P. S. Tilcock, and P. R. Cullis, *Biochemistry* **27**, 2853 (1988).
- 24) R. Koynova and M. Caffrey, *Chem. Phys. Lipids* **69**, 1 (1994).
- 25) S. Kaneshina, H. Ichimori, T. Hata, and H. Matsuki, *Biochim. Biophys. Acta* **1374**, 1 (1998).
- 26) R. N. A. H. Lewis, B. D. Sykes, and R. N. McElhaney, *Biochemistry* **27**, 880 (1988).
- 27) H. Aoki and M. Kodama, *Thermochim. Acta* **308**, 77 (1998).

要 旨

リン脂質二分子膜は温度、圧力、塩濃度などの環境因子に依存し、様々な相転移を起こす。脂質二分子膜相転移の検出には示差走査熱量測定が特に効果的であるが、それらの熱的情報を圧力測定から得られた結果と組み合わせることで脂質二分子膜相転移の熱力学理解を深めることが可能となる。生体膜研究において繁用されているリン脂質が形成する二分子膜の相転移を解説し、高圧下における相転移測定を紹介した。続いて疎水鎖種類（アシル鎖の不飽和度）および極性基サイズの異なるホスファチジルエタノールアミン同族体における二分子膜相転移を取り上げ、相転移温度の圧力依存性、温度-圧力相図および相転移に伴う熱力学量変化を用いてこれら脂質二分子膜の相転移を熱力学的に特徴づけた。



松木 均 Hitoshi Matsuki
 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス
 研究部ライフシステム部門, Dept. of Life
 System, Institutes of Technology and
 Science, The Univ. of Tokushima, TEL:
 088-656-7520, FAX: 088-655-3162, e-
 mail: matsuki@bio.tokushima-u.ac.jp
 研究テーマ：脂質分子の集合特性と膜作
 用性薬物メカニズム
 趣味：Macによる仕事・雑事の合理化



金品昌志 Shoji Kaneshina
 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス
 研究部ライフシステム部門, Dept. of Life
 System, Institutes of Technology and
 Science, The Univ. of Tokushima, TEL:
 088-656-7513, FAX: 088-655-3162, e-
 mail: kanesina@bio.tokushima-u.ac.jp
 研究テーマ：脂質膜を中心とした高圧生
 物科学
 趣味：旅行、読書