


 解説

非対称鎖を有するスフィンゴリン脂質2分子膜の相転移現象

川崎佑子, 児玉美智子

(受取日: 2006年4月17日, 受理日: 2006年6月28日)

**Phase Transition Behavior of the Highly Asymmetric Chain Length
N-lignoceroylsphingomyelin (C24:0-SM) Bilayer System**

Yuko Kawasaki and Michiko Kodama

(Received April 17, 2006; Accepted June 28, 2006)

A study on phase transition behavior of sphingophospholipid-water system was performed for the highly asymmetric chain length N-lignoceroylsphingomyelin (C24:0-SM) with a differential scanning microcalorimetry (DSC). The C24:0-SM was partially synthesized by a deacylation-reacylation process with naturally occurring sphingomyelin used as a starting material. The C24:0-SM showed a low-temperature phase transition of the subgel-to-gel phase (T_S), successively followed by the common phase transition of the gel-to-liquid crystal phase (T_M). The T_S transition enthalpy decreased with an increase in periods of thermal annealing performed at the T_M transition temperature. This indicated that the T_M transition accompanies a change in the packing mode which proceeds very slowly up to the annealing periods of 9 h. In this accord, the electron micrographs of the subgel phase showed a drastic structural change of planer bilayer stacks into multilamellar vesicles and finally into small size unilamellar vesicles, which appear with increasing the periods of the annealing.

1. はじめに

細胞膜および生体膜は、主成分である脂質分子で構成された2分子膜を基本構造とする。これまで、SingerとNicolsonによって提唱された流動モザイクモデルが、細胞膜および生体膜のモデル構造として捉えられており、このモデル構造では、種々の脂質分子が均一に分布していると考えられている。しかしながら1997年に、エンドサイトーシスやトランスサイトーシスなどの膜機能化の際に、特殊なマイクロドメイン構造が生体膜中に形成されることが報告された。¹⁾ このマイクロドメインは一般にラフト (いかだ) やカベオラ (くぼみ) と呼ばれ、スフィンゴ脂質とコレステロールの集合体から構成されている。これに関連して、ス

フィンゴ脂質の大部分がこれらのマイクロドメインに局在していることが報告されており、^{2,3)} このスフィンゴ脂質に対して研究者の熱い視線が注がれるようになってきた。

1970年代前半からすでに、最も代表的なスフィンゴリン脂質であるスフィンゴミエリン (SM) は、多くの物理化学研究の対象物質として取り上げられてきた。これらの研究は、SMのスフィンゴシン骨格が、グリセロリン脂質のグリセロール骨格とは異なるスフィンゴシン骨格を有するという観点から行われた。これらの研究において、^{4,8)} 天然の生体膜に存在するSMは、一方の鎖であるスフィンゴシン鎖の鎖長が炭素数18と固定されているのに対して、もう一方の鎖であるアシル鎖には少なくとも炭素数14~24にわたる、種々の鎖長分子種が存在することが報告されており、

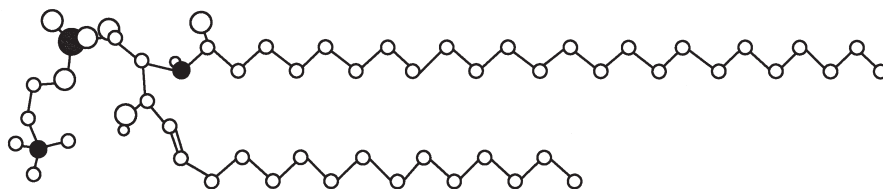


Fig.1 Model structure of the *N*-lignoceroylsphingomyelin (C24:0-SM). A backbone structure was drawn by reference to a paper reported by Pascher *et al.*³²⁾

アシル鎖の炭素数が20から24までのSMは、非対称鎖の分子種と呼ばれている。このような非対称鎖を有するSMが、生体膜内でのドメインの構造化と機能化にどのような役割を果たしているかが問題として提起される。このような観点から、最も鎖長の非対称性が著しい、**Fig.1**に示す炭素数24の飽和脂肪酸を有する*N*-リグノセロイルスフィンゴミエリン (C24:0-SM) に着目した。これまでの「C24:0-SM-水」系に関する熱的研究においては、「脂質-水」系の一般的な相転移現象であるゲル-液晶相転移に加えて、低温領域にサブゲル相からゲル相への転移現象が出現することが報告されている。⁹⁻¹³⁾ すなわち、低温領域にゲル相に変わる安定相が存在する。しかしながら、従来の研究結果では、サブゲル-ゲル相転移挙動は報告によって異なり、例えば、この転移に伴うエンタルピー変化は11.3から19.2 kJ (mol lipid)⁻¹と大きく異なっている。我々は、この違いには、試料の熱履歴が関係していると考ええる。このような観点から、本研究においては、試料に対する熱処理を含めた熱履歴を十分に検討した上で、この著しい非対称鎖C24:0-SMの2分子膜の相転移挙動をマイクロ熱測定で検討した。さらに、この非対称鎖SMの2分子膜様集合形態を、ネガティブ染色法による電子顕微鏡観察により検討した。

2. 実験

2.1 試料

N-リグノセロイルスフィンゴミエリン (C24:0-SM) は、Sripadaらによって確立された方法に従って半合成された。¹³⁾ この方法は、天然の牛脳由来スフィンゴミエリン (シグマ社, Lot No. 122K0367) を用い、脱アシル化とその後の再アシル化に基づくものである。しかしながら、この方法においては、脱アシル化の際にスフィンゴシンの3位の炭素でD-erythro体からL-threo体への異性化が生じることが報告されている。^{13,14)} そこで本研究では、この異性化をできる限り抑えるために、脱アシル化反応を一般に用いられている温度よりも低い50℃で行った。これによって、異性化は他の研究者が報告している約30%よりもかなり低い10%以下に抑えられた。^{13,14)} 最終生成物であるC24:0-

SMの純度は、薄層、高速液体クロマトグラフィー、正イオンエレクトロスプレーイオン化質量測定、および¹H-, ¹³C-NMR測定によって、99%以上であることを確認した。

2.2 ベシクル懸濁液の調製

C24:0-SMのベシクル懸濁液は、Bangham法に従って調製された¹⁵⁾；目的量のC24:0-SMをクロロホルムに溶解させ、高真空下 (10⁻⁴ Pa) で完全にこの溶媒を除去することで、この脂質の薄膜を作製した。本研究は、本文中で述べるように、ゲル-液晶相転移温度を試料が経験したか否かによって、熱的挙動が大きく異なることを明らかにしている。従って、これを考慮して、薄膜をゲル相温度で水に懸濁した。これらの操作は温度5℃に制御した低温室で行った。このようにして調製したベシクル懸濁液は、熱測定および電子顕微鏡測定に供するまでゲル相の温度で保持した。

2.3 示差走査熱量測定 (DSC)

熱測定はマイクロキャル社製VP型示差走査熱量計を用いて、0から70℃の温度範囲を、昇温速度0.75℃ min⁻¹で行った。この熱量計のセル体積は約0.52 mLであり、用いたベシクル懸濁液の脂質濃度は約0.5 mMである。本測定においては、ベシクル懸濁液がゲル-液晶相転移温度以上の温度を経験しないように、十分な注意を払ってあらかじめ0℃に冷却した熱量計セルに移した。測定後、熱量計セルからベシクル懸濁液を取り出し、パレット法に従ってこの試料中のリン酸を定量することで、脂質濃度を決定した。¹⁶⁾

2.4 ネガティブ染色法による電子顕微鏡観察

電子顕微鏡観察は、日本電子社製JEM-2000EXおよび日立社製H-8100高分解能透過電子顕微鏡装置を用いて、~20℃で行った。ベシクル標本は以下の方法に従って作製した¹⁷⁾；銅製メッシュにコロジオン支持膜を張り、カーボン蒸着することで作製した試料用グリッドに、ベシクル懸濁液一滴を滴下し、乾燥させた。この後に、染色剤である2% (w/v) -リンタングステン酸 (pH 7) を加え、余分の溶液を排水し、乾燥させて標本作製した。本研究では、

C24:0-SM が形成するベシクルに種々の熱履歴を与え、これらの熱履歴によってベシクルの低温相であるサブゲル相の形態がいかに変化するかを検討した。この研究目的にそって、定着、染色、および乾燥などのベシクル標本作製に係る全ての行程は、温度5℃に設定した低温室で行った。¹⁸⁾ 上述の方法によって得られたベシクル標本は、直ちに電子顕微鏡観察に供した。

3. C24:0-SM2 分子膜の T_S および T_M 転移挙動

ゲル相温度で調製したC24:0-SM ベシクル懸濁液のDSCを温度0から70℃の範囲で連続的に昇降温を繰り返して行った。Fig.2は、昇温によって得られた代表的なDSC曲線を示す。初回の昇温DSC結果をFig.2(a)に示すが、二つの吸熱ピークが温度37.4および45.7℃に観測された。高温側の吸熱ピークは、2本の脂質炭化水素鎖の融解に基づくゲル-液晶相転移に相当し、これを T_M で示す。この T_M 転移以下の温度領域では、この脂質2分子膜はゲル相として存在する。従って、低温側の吸熱ピークの出現は、このピーク以下の温度領域に、ゲル相とは異なる低温相が存在することを示す。「グリセロリン脂質-水」系において同様の低温相が存在することが報告されており、この相は一般にサブゲル相と呼ばれている。¹⁹⁻²¹⁾ 本研究で得られたこの低温相がサブゲル相と同等であるか否かは明確ではないが、以下では我々はこの相をサブゲル相として取り扱うこととする。したがって、低温側の相転移は、このサブゲル相からゲル相への転移に対応し、この転移を T_S で表わす。Fig.2(b)-(d)に35回まで行った繰り返しの昇温DSCの代表的なサーモグラムを示す。Fig.2(b),(c)および(d)はそれぞれ、3回、10回および30回の繰り返しDSCによって得られた結果である。Fig.2に示すサーモグラムを比較すると、 T_S 転移ピークに著しい変化が見られる。すなわち、繰り返しのDSC回数の増大に伴って、 T_S 転移ピークの高さは低下し、それと同時に低温側の肩ピークの成長に伴いピークは幅広化する。この結果は、 T_S 転移ピークの面積が、DSCを繰り返すごとに減少することを示唆する。 T_S 転移に伴うエンタルピー変化の昇温DSCの繰り返しの回数に対するプロットをFig.3に示す。比較のために、 T_M 転移に伴うエンタルピー変化も同様にプロットした。この図から、初回の昇温DSCで得られた大きな T_S 転移エンタルピー、25.9 kJ (mol lipid)⁻¹は、10回までの繰り返しのDSCによって急激に減少し、その後も徐々に減少する傾向にあることがわかる。最終的には、30回までの繰り返し昇温によって、 T_S 転移エンタルピーは16.9 kJ (mol lipid)⁻¹にまで減少した。その後の繰り返しのDSCによっては、 T_S 転移エンタルピーに変化はみられなかった。すなわち、この繰り返しDSCによって T_S 転移エンタルピーは約40%も減少した。また、 T_M

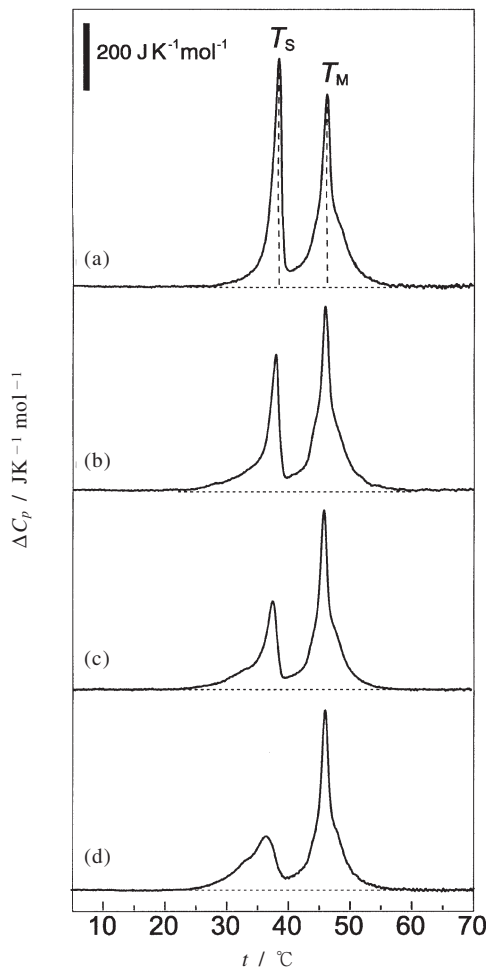


Fig.2 Typical heating DSC curves obtained by repeating thermal cyclings in the temperature range of 0 to 70℃ for a vesicle dispersion of the *N*-lignoceroylsphingomyelin (C24:0-SM). The vesicle dispersion was prepared at a temperature of the gel phase. The number of repeated heating scans: (a) 1, (b) 3, (c) 10, (d) 30. Apparent excess heat capacity (ΔC_p) is plotted as a function of temperature (t).

転移エンタルピー変化も減少傾向を示し、初回の36.0 kJ (mol lipid)⁻¹から最終の32.6 kJ (mol lipid)⁻¹まで、約10%減少した。以上の結果から、繰り返しのDSCを行うことによって、サブゲル相をエンタルピー的に不安定化することが明らかになった。

4. T_S 転移エンタルピーを著しく減少させる熱処理

ここで、 T_S 転移エンタルピーの著しい減少が、 T_S および

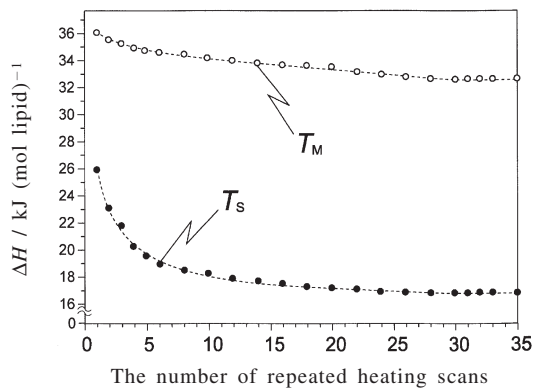


Fig.3 Variation of phase transition enthalpies (ΔH) of the C24:0-SM dispersion with an increase in the number of repeated heating scans shown in Fig.2. The phase transition enthalpy is compared for the subgel-to-gel phase (T_S) and the gel-to-liquid crystal phase (T_M) transition.

T_M 転移のどちらと関係しているのか、ということをはっきりさせるために、次の実験を行った。ゲル相温度で調製した C24:0-SM ベシクル懸濁液の 0℃ から T_S 転移を越えた 39.5℃ までの温度範囲で昇降温を 5 回まで繰り返して DSC を行った。初回および 5 回の繰り返し昇温 DSC の結果を **Fig.4(a)** および **(b)** にそれぞれ示す。この図に示すように、5 回の繰り返し昇温 DSC を行っても、 T_S 転移ピークに何ら、変化は観測されなかった。この繰り返し昇温 DSC の後、液晶相の温度 70℃ までの昇温 DSC を行ったところ、得られた熱的挙動 (**Fig.4(c)**) は **Fig.2(a)** に示す結果と同一であった。この結果は、 T_S 転移が可逆的相転移であることを示す。従って、 T_S 転移エンタルピーの減少は、 T_S 転移を経験したことに基づくものではない。この事をさらに確かめるために、ゲル相温度で調製したベシクル懸濁液を熱量計セルに移し、 T_S 転移の中間温度、37.4℃ で 15 時間保持することによって熱処理を施し、その後 0℃ まで冷却し、昇温 DSC を行った。その結果、得られた熱的挙動は **Fig.4(c)** に示すサーモグラムと同一であり、 T_S 転移ピークに何ら、変化は観測されなかった。これに関連して、代表的なグリセロリン脂質である「ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) - 水」および「ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン (DMPE) - 水」系のサブゲル相は、昇温によって一度ゲル相に至ると、冷却によって過冷却ゲル相へと移行するため、熱処理を施さない限り、このサブゲル相は実現されない。¹⁹⁻²¹⁾ すなわち、この過冷却ゲル相は極めてゆっくりとした速度でサブゲル相に移行する。この点において、C24:0-SM の低温サブゲル相は、グリセロリン脂

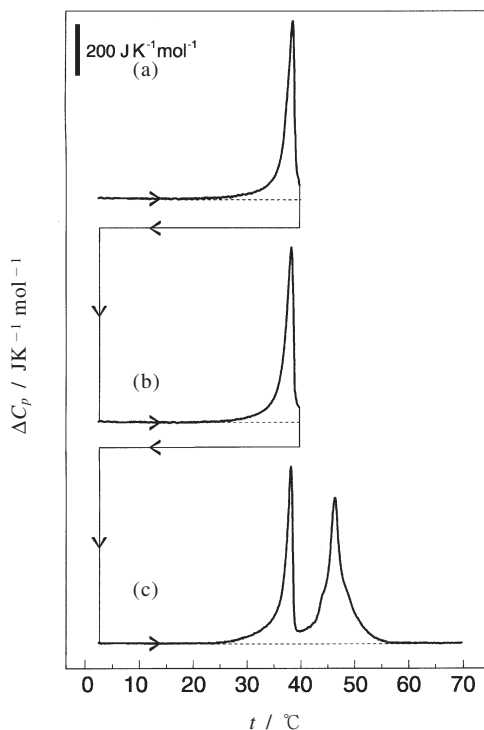


Fig.4 Comparison of typical heating DSC curves of (a) first and (b) fifth scans obtained by repeating thermal cyclings in the temperature range of 0 to 39.5℃ for the C24:0-SM dispersion. A curve (c) was obtained in the sixth scan. Apparent excess heat capacity (ΔC_p) is plotted as a function of temperature (t).

質のサブゲル相とは異なる。

以上の結果から、 T_S 転移エンタルピーの減少には、 T_M 転移が関係していることが示唆された。これを明らかにするために、**Fig.5(a)** に示すように、ゲル相温度で調製した C24:0-SM ベシクル懸濁液を用いて 0℃ から T_M 転移の中間温度、45.7℃ までの昇温 DSC を行い、この温度で最大 15 時間までの異なる期間で熱処理を施した。その後、この熱処理試料を 0℃ まで通常速度 (1℃ min⁻¹) で冷却し、昇温 DSC を行った。3 時間および 9 時間の熱処理を行った試料の DSC 曲線を、**Fig.5(b)** および **(c)** にそれぞれ示す。これらのサーモグラムを比較すると、熱処理時間の増大に伴って T_S 転移ピークの高さの低下と幅広化が示される。**Fig.6** に、 T_S 転移に伴われるエンタルピー変化を熱処理時間に対してプロットした結果を示す。この図を参照すると、 T_S 転移エンタルピーは熱処理時間の増大に伴って減少しており、これは **Fig.3** に示す繰り返しの DSC 回数増大に伴う T_S 転移エンタルピーの減少と同様の傾向を示している。また、

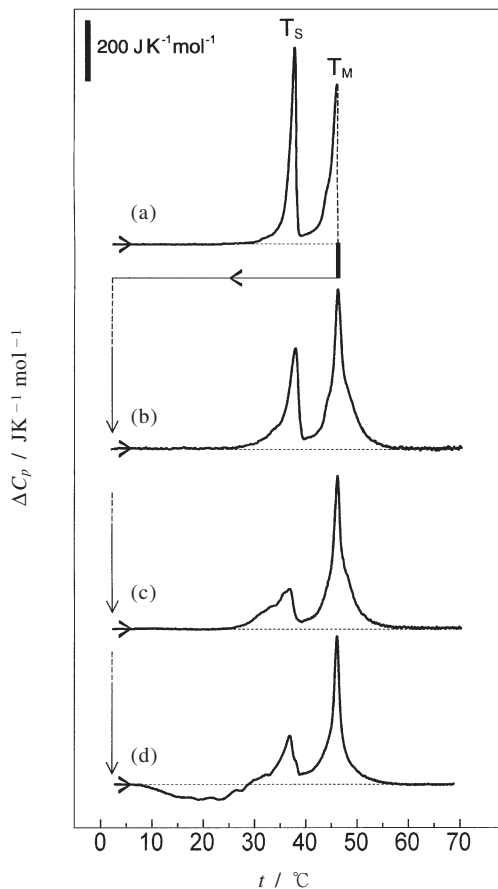


Fig.5 Effect of increasing the period of annealing at a temperature of the gel-to-liquid crystal phase (T_M) transition on the phase transition behavior of the C24:0-SM dispersion. The dispersion prepared at the gel phase temperature was scanned up to the temperature of T_M transition and was then annealed at this temperature for different periods (a). The annealed samples were cooled to 0 °C and were then scanned. The resulting heating DSC curve is compared for the annealing periods of (b) 3 and (c) 9 h. The dispersion annealed for periods above 9 h was quenched rapidly to 0 °C and was then scanned (d). Apparent excess heat capacity (ΔC_p) is plotted as a function of temperature (t).

Fig.5(c)に示す9時間の熱処理を施すことによって得られた T_S 転移ピークを、**Fig.2(d)**に示す30回の繰り返しDSCを行って得られた T_S 転移ピークと比較すると、両者の形状はほぼ同じであることが示される。最長の15時間にわたる熱

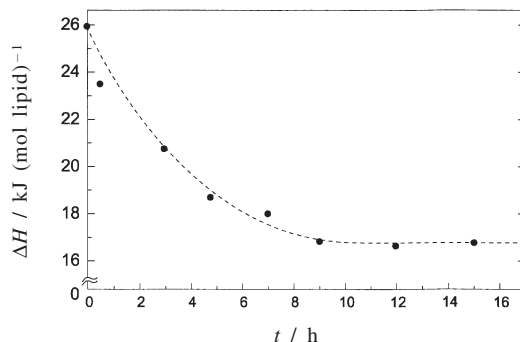


Fig.6 Variation of the enthalpy change (ΔH) associated with the subgel-to-gel phase (T_S) transition of the C24:0-SM dispersion with increasing the period of annealing at the gel-to-liquid crystal phase (T_M) transition.

処理を行った試料においても、**Fig.5(c)**と同一の T_S 転移ピークが観測された。さらに、これらの熱処理試料を、装置の最大速度である約 $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ で $0\text{ }^\circ\text{C}$ まで急冷し、その後昇温DSCを行うことによって冷却速度の効果を検討した。熱処理が9時間以上の試料においては**Fig.5(c)**とは異なる熱的挙動が観測され、その結果を**Fig.5(d)**に示す。すなわち、温度8から27℃にわたり明確な発熱ピークが観測され、これに続いて T_S 転移ピークが観測された。低温側での発熱現象に伴うエンタルピー変化およびこれに続いて観測された T_S 転移エンタルピーはそれぞれ、 $12.6\text{ kJ (mol lipid)}^{-1}$ および $13.4\text{ kJ (mol lipid)}^{-1}$ であり、ほぼ等しい値である。次に、液晶相温度での熱処理効果を検討するために、ゲル相温度で調製した試料を、装置の最大速度である $\sim 10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ で液晶相温度の $70\text{ }^\circ\text{C}$ まで急速に昇温し、この温度で15時間試料を熱処理した後に $0\text{ }^\circ\text{C}$ まで急冷し、昇温DSCを行った。その結果、**Fig.2(a)**に示すのと類似の T_S 転移ピークが観測された。この結果は、 T_S 転移エンタルピーの減少に対して、液晶相温度での熱処理が何ら寄与していないことを示す。

5. C24:0-SM2分子膜の T_M 転移の特性

以上の T_S 転移温度、 T_M 転移温度、および液晶相温度での熱処理実験から、 T_S 転移エンタルピーは、試料が T_M 転移温度を経験した熱処理時間に伴って減少することが明らかになった。一般に、「脂質-水」系の T_M 転移では、ゲル相で *trans-zig-zag* 配位をとる脂質炭化水素鎖が *gauche* 配位を取り込むことに基づく鎖の融解が生じる。これまでの研究からは、この T_M 転移は昇温によって得られた液晶相が冷却によって再びもとのゲル相に転移する可逆的相転移であることが報告されている。これに関連して、代表的なグリセロ

リン脂質である「ホスファチジルコリン (PC) -水」系においては、X線回折研究から、ゲル相と液晶相における脂質炭化水素鎖の充填様式が、基本的には類似のヘキサゴナル構造であることが明らかにされている。²²⁾ 従って、この系の液晶相では、ゲル相の鎖の充填様式を保持したまま、*gauche* 構造を入れ込むことによる体積膨張が生じていると考えられる。しかしながら、本研究の対象である「C24:0-SM-水」系においては、Fig.3に示すように、DSCを連続的に繰り返し行うことによって T_M 転移エンタルピーは36.0から32.6 kJ (mol lipid)⁻¹まで、約3 kJ (mol lipid)⁻¹減少する。これは従来の報告とは異なり、本研究で用いた著しい非対称鎖のC24:0-SMの T_M 転移が可逆的な相転移でないことを示している。すなわち、本研究の対象である「C24:0-SM-水」系においては、ゲル相と液晶相において選択する脂質炭化水素鎖の充填様式が異なることが予想される。従って、C24:0-SM2分子膜の T_M 転移は炭化水素鎖の融解現象のみで説明することは出来ない。すなわち、速い速度で進行する鎖の融解現象に加えて、非常に遅い速度で進行する別の現象を伴うことが示唆される。この遅い速度で進行する現象は、脂質分子の炭化水素鎖が2分子膜中で位置の組み替えを行うことによって、液晶相にとって好都合な充填様式へと変化することに基づくと推察される。この組み替えは炭化水素鎖間の協同現象によって進行するために長時間を要し、ゲル相とは異なる充填様式へと徐々に移行するのであろう。この新たに生じた充填は液晶相に至っても持続され、冷却によって出現したゲル相およびサブゲル相においても、同様に持続される。しかしながら、この新たな充填様式はゲル相と同様にサブゲル相にとっても不都合であるため、Fig.5(a),(b)および(c)の T_S 転移によって特性されるこれらサブゲル相の安定性は、この順で低下する。これに関連して、「C24:0-SM-水」系の熱測定による研究で報告されている T_S 転移エンタルピー⁹⁻¹³⁾を比較すると、19.2 kJ (mol lipid)⁻¹ (Cohen *et al.*), 18.0 kJ (mol lipid)⁻¹ (Sripada *et al.*), 11.7 kJ (mol lipid)⁻¹ (McIntosh *et al.*), 17.2 kJ (mol lipid)⁻¹ (McIntosh *et al.*), 12.6 kJ (mol lipid)⁻¹ (Maulik *et al.*), および11.3 kJ (mol lipid)⁻¹ (Bar *et al.*) と異なっており、しかも本研究で得られた T_S 転移エンタルピー、25.9 kJ (mol lipid)⁻¹よりもかなり小さい。この原因としては、従来のこれらの研究においては、試料調製の際に試料が T_M 転移温度を経験しているために、安定性の低いサブゲル相を用いたことが考えられる。

ここで、 T_M 転移中点温度で試料を十分に熱処理した後に、0℃まで急冷することで得られたFig.5(d)に示す発熱現象と、この発熱現象に伴われるエンタルピー変化とこれに続いて出現する T_S 転移エンタルピー変化の大きさがほぼ等しいことに着目する。これらを考慮すると、この発熱現象は、0℃

の低温領域においてもゲル相が過冷却相として存続することを示す。この過冷却ゲル相を昇温すると、サブゲル相へと移行するために発熱現象が観測され、続いての昇温において、このサブゲル相からゲル相への転移が出現したと考えられる。さらに、この T_S 転移に伴うエンタルピー変化が13.4 kJ (mol lipid)⁻¹と小さい値であることを考慮するならば、過冷却ゲル相は安定性のかなり低いサブゲル相に移行したと考えられる。そこでこの発熱現象に着目し、過冷却ゲル相に対してこの発熱温度領域で熱処理を施した。その結果、この熱処理時間の増大に伴って T_S 転移ピークは成長してゆき、最終的には、20日間の熱処理によって、Fig.5(a)に示す大きな転移エンタルピーで特性される T_S 転移ピークへと成長した。この結果は、熱処理を行うことで脂質炭化水素鎖が極めてゆっくりとした速度で位置の組み替えを行い、より安定性の高いサブゲル相を実現可能な充填様式へと移行したことを示す。

6. C24:0-SM2 分子膜のサブゲル相における集合形態

以上の熱測定研究に基づいて、Fig.5(a),(b)および(c)に示す T_S 転移ピークで特性されるサブゲル相での2分子膜様集合形態を、電子顕微鏡観察によって検討した。Fig.5(a),(b),(c)に示す T_S 転移によって特性されるサブゲル相の電子顕微鏡写真をFig.7(a),(b),(c)にそれぞれ示す。Fig.7(a)の電子顕微鏡写真においては、最も安定なサブゲル相は平板状の表面を有する2分子膜が規則正しく積み重なった層状構造を形成していることが示される。Fig.7(b)に T_M 転移温度で3時間の熱処理を行った後に得られたサブゲル相の電子顕微鏡写真を示すが、内水相を有する直径約400 nmの多重膜ベシクルと、1~2重膜によって囲まれた内水相を有する比較的小さいサイズ(直径約150 nm)のベシクルが共存しているのが観測された。しかしながら、この多重膜ベシクルにおいては、Fig.7(a)に示されるような規則正しい多重性が見られない。Fig.7(c)に、 T_M 転移温度で9時間以上の充分な熱処理を施した後に得られたサブゲル相の電子顕微鏡写真を示すが、1重膜ベシクルのみが観測された。この1重膜ベシクルの粒度分布をFig.8に示すが、このベシクルのサイズは比較的均一で、平均直径は~110 nmと見積られた。さらに、Fig.5(c)のサーモグラムで特性される試料の、液晶相温度での集合形態を観察した。この実験においては、液晶相の温度約60℃に調節したホットプレートの上でベシクル標本を作製し、直ちに電子顕微鏡観察を行った。この電子顕微鏡観察においては、液晶相においてもFig.7(c)に示すのと同様の1重膜ベシクルを形成していることが明らかになった。以上の電子顕微鏡研究からは、 T_M 転移温度での熱処理時間の増大に伴って、著しく非対称

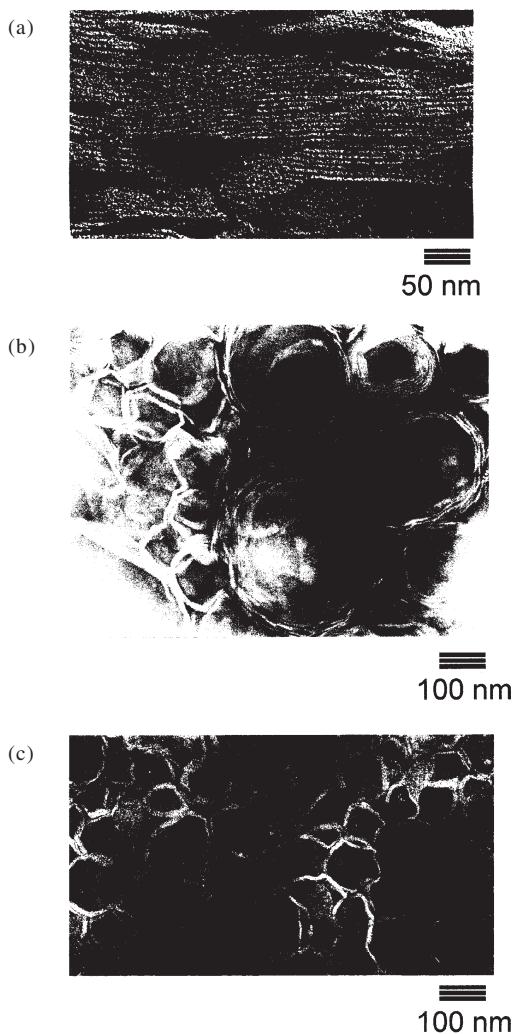


Fig.7 Comparison of electron micrographs of the subgel phases of the C24:0-SM-water system. The electron micrographs (a), (b) and (c) were obtained for the subgel phases characterized by the subgel-to-gel phase (T_S) transitions shown in Fig.5(a), (b) and (c) respectively.

鎖であるC24:0-SMのサブゲル相の集合形態は、平板状の多重層構造体から、大きいサイズの多重膜ベシクルを経て、最終的には比較的小さいサイズの1重膜ベシクルまで、膜表面の曲率を増大させる方向に、著しく変化することが明らかとなった。

7. C24:0-SMのサブゲル相での2分子膜様充填様式 に対する考察

これまでの「脂質-水」系のゲル相での脂質2分子膜配

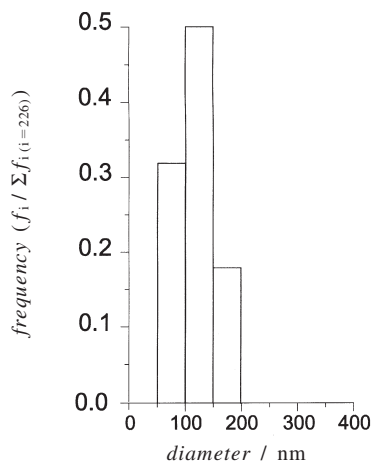


Fig.8 Size distribution for unilamellar vesicles of the C24:0-SM obtained after the thermal annealing at a temperature of the gel-to-liquid crystal phase (T_M) transition. The diagram was constructed by counting approximately 220 vesicles in the negative stain electron micrographs. Frequency, $f_i / \sum f_i$ ($=226$), is plotted as a function of the vesicle diameter. The mean diameter of these vesicles is ~ 110 nm.

列に関する研究においては、脂質分子の充填様式を決定するのは炭化水素鎖間の距離に依存する van der Waals 力であることが明らかにされている。^{23,24} 脂質分子はこの van der Waals 力を最大にするための充填様式を模索する。さらに、サブゲル相は、ゲル相に比べてこの van der Waals 力が更に強められた相であることが報告されている。^{23,24} この鎖間に働く van der Waals 力を考慮して、非対称鎖を有する脂質分子は、2分子膜構造において入れ込み型充填様式を選択することが報告されている。²⁵⁻²⁷ これまでのX線回折、およびラマン分光の研究から、本研究で用いた著しく非対称鎖のC24:0-SMに対して、**Fig.9**に示す部分的入れ込み型充填様式**(a)**と完全入れ込み型充填様式**(b)**が提唱されている。^{10-12,28,29} 大きな T_S 転移エンタルピーで特性される、最も安定性の高いサブゲル相が平板状の多重層構造であることを考慮するならば、このサブゲル相は**Fig.9(b)**に示す完全入れ込み型充填を選択していることが推測される。この最安定サブゲル相に比べて安定性の低い、**Fig.2(d)**の T_S 転移ピークで特性されるサブゲル相は大きく構造が異なり、曲率の高い1重膜ベシクルである。**Fig.9(b)**に示す完全入れ込み型充填では、高い表面曲率の1重膜ベシクルを形成することは不可能であり、炭化水素鎖の充填様式を変化させる必要がある。従って、 T_M 転移におけるゆっくりした速度で進行する転移現象は、鎖の充填様式を完全入れ込

(a) Partial interdigitation (b) Full interdigitation

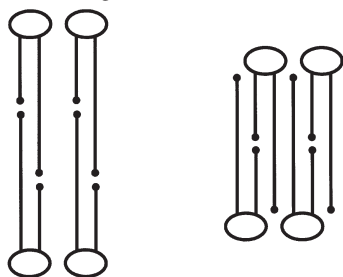


Fig.9 Two types of interdigitated bilayer structures: (a) partial interdigitation and (b) full interdigitation.

み型充填から高い表面曲率を可能にする **Fig.9(a)** に示す部分的入れ込み型充填へと変化させることによって生じると推測される。さらに、表面曲率の高い2分子膜構造を形成するためには、内膜および外膜の脂質分子がそれぞれ、コーン型および逆コーン型の、全く異なる分子形状を選択することが要求される。^{30,31)} **Fig.9(a)** に示す部分的入れ込み型充填では、短いスフィンゴシン鎖の末端メチル基の回転運動が、隣接する長いアシル鎖の中に、*gauche* 配位に基づく kink (ねじれ) 構造を導入すると考えられる。²⁷⁾ このようなアシル鎖の kink 構造は、非対称鎖 C24:0-SM がコーン型および逆コーン型の、二つの異なる形状の分子構造を選択することを可能にするのだろう。この分子構造は、冷却によって出現するゲル相およびそれに続いてのサブゲル相においてもなお維持されるために、**Fig.7(c)** に示すような、高い表面曲率の比較的小さいサイズの1重膜ベシクルを形成することが可能になったと考えられる。

文 献

- 1) K. Simons and E. Ikonen, *Nature* **387**, 569 (1997).
- 2) A. Prinetti, V. Chigorno, G. Tettamanti, and S. Sonnino, *J. Biol. Chem.* **275**, 11658 (2000).
- 3) U. Ortgren, M. Karlsson, N. Blazic, M. Blomqvist, F. H. Nystrom, J. Gustavsson, P. Fredman, and P. Stralfors, *Eur. J. Biochem.* **271**, 2028 (2004).
- 4) W. I. Calhoun and G. G. Shipley, *Biochim. Biophys. Acta* **555**, 436 (1979).
- 5) J. L. Kerwin, A. R. Tuininga, and L. H. Ericsson, *J. Lipid Res.* **35**, 1102 (1994).
- 6) M. Kodama, M. Abe, Y. Kawasaki, K. Hayashi, S. Ohira, H. Nozaki, C. Katagiri, K. Inoue, and H. Takahashi, *Thermochim. Acta* **416**, 105 (2004).
- 7) R. Koynova and M. Caffrey, *Biochim. Biophys. Acta* **1255**, 213 (1995).
- 8) S. H. Untracht and G. G. Shipley, *J. Biol. Chem.* **252**, 4449 (1977).
- 9) R. Cohen, Y. Barenholz, S. Gatt, and A. Dagan, *Chem. Phys. Lipids* **35**, 371 (1984).
- 10) T. J. McIntosh, S. A. Simon, D. Needham, and C. Huang, *Biochemistry* **31**, 2012 (1992).
- 11) P. R. Maulik and G. G. Shipley, *Biophys. J.* **69**, 1909 (1995).
- 12) L. K. Bar, Y. Barenholz, and T. E. Thompson, *Biochemistry* **36**, 2507 (1997).
- 13) P. K. Sripada, P. R. Maulik, J. A. Hamilton, and G. G. Shipley, *J. Lipids Res.* **28**, 710 (1987).
- 14) B. Ramstedt and J. P. Slotte, *Biophys. J.* **76**, 908 (1999).
- 15) A. D. Bangham, M. W. Hill, and N. G. A. Miller, *Methods Membr. Biol.* **1**, 1 (1974).
- 16) G. V. Marinetti, *J. Lipid Res.* **3**, 1 (1962).
- 17) M. Kodama, T. Miyata, and Y. Takaichi, *Biochim. Biophys. Acta* **1169**, 90 (1993).
- 18) M. Kodama, H. Aoki, and T. Miyata, *Biophys. Chem.* **79**, 205 (1999).
- 19) M. Kodama and H. Aoki, in "Thermal Behavior of Dispersed Systems", N. Garti, Ed., Surfactant Science Series 93, Marcel Dekker, New York, pp.247 (2000).
- 20) M. Kodama, H. Hashigami, and S. Seki, *J. Colloid Interface Sci.* **117**, 497 (1986).
- 21) M. Kodama, H. Kato, and H. Aoki, *Thermochim. Acta.* **352-353**, 213 (2000).
- 22) M. I. Ruocco and G. G. Shipley, *Biochim. Biophys. Acta* **691**, 309 (1982).
- 23) J. F. Nagle and D. A. Wilkinson, *Biophys. J.* **23**, 159 (1978).
- 24) D. A. Wilkinson and J. F. Nagle, *Biochemistry* **20**, 187 (1981).
- 25) C. Hang and J. T. Mason, *Biochim. Biophys. Acta* **864**, 423 (1986).
- 26) J. T. Mason, R. R. Cunningham, and T. J. O'Leary, *Biochim. Biophys. Acta* **1236**, 65 (1995).
- 27) S. W. Hui, J. T. Mason, and C. Huang, *Biochemistry* **23**, 5570 (1984).
- 28) I. W. Levin, T. E. Thompson, Y. Barenholz, and C. Huang, *Biochemistry* **24**, 6282 (1985).
- 29) P. R. Maulik, D. Atkinson, and G. G. Shipley, *Biophys. J.* **50**, 1071 (1986).
- 30) R. N. A. H. Lewis, D. A. Mannock, and R. N. McElhaney, in "Lipid Polymorphism and Membrane Properties", R. E. Eppand, Ed., Academic Press, pp.25 (1997).
- 31) C. Hang and J. T. Mason, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 308 (1978).
- 32) I. Pascher and S. Sundell, *Chem. Phys. Lipids* **20**, 175 (1977).

要 旨

本研究では、スフィンゴシン鎖とアシル鎖の鎖長が著しく非対称の*N*-リグノセロイルスフィンゴミエリン (C24:0-SM) のサブゲル相 (T_S) およびゲル-液晶 (T_M) 相転移挙動をマイクロ示差走査熱量測定 (DSC) によって検討した。ゲル相温度で調製した C24:0-SM ベシクル懸濁液の DSC を連続的に昇降温を繰り返して行ったところ、 T_M 転移エンタルピーは 36.0 から 32.6 kJ (mol lipid)⁻¹ までの、僅かな減少であったが、 T_S 転移エンタルピーは、25.9 から 16.9 kJ (mol lipid)⁻¹ まで、約 40 % も減少した。この T_S 転移エンタルピーの大きな減少の原因を明らかにするために、ゲル相温度で調製した C24:0-SM ベシクル懸濁液を異なる温度で 15 時間の期間にわたって熱処理を施した。その結果、 T_S 転移は可逆的相転移であるのに対して、 T_M 転移は可逆的相転移ではないこと、すなわち、 T_M 転移温度での熱処理時間の増大に伴って、 T_S 転移エンタルピーは著しく減少することが明らかになった。さらに、C24:0-SM2 分子膜の低温サブゲル相での集合形態を電子顕微鏡観察によって検討した。その結果、 T_M 転移温度での熱処理時間の増大に伴って、C24:0-SM のサブゲル相の集合形態は、平板状の多重層構造から、大きいサイズの多重膜ベシクルを経て、最終的には比較的小さいサイズの 1 重膜ベシクルまで、膜表面の曲率を増大させる方向に、著しく変化することが明らかとなった。

川崎佑子 Yuko Kawasaki

岡山理科大学大学院博士課程 理学研究科材質理学専攻,
Dept. of Material Science, Graduate School of Science
(Doctoral Course), Okayama University of Science, TEL.
086-256-9412, FAX. 086-255-7700, e-mail:
pyukokawasaki@yahoo.co.jp

研究テーマ：脂質 2 分子膜の相転移現象ならびに水分子との相互作用

趣味：料理

児玉美智子 Michiko Kodama

岡山理科大学理学部生物化学科, Dept. of Biochemistry,
Faculty of Science, Okayama University of Science,
TEL.&FAX. 086-256-9437, e-mail: kodama@dbc.ous.ac.jp

研究テーマ：脂質 2 分子膜の相転移現象ならびに水分子との相互作用

趣味：日本画

