解 説

飽和ジアシルホスファチジルコリン二重膜の 温度および圧力誘起相転移

松木 均,後藤 優樹,玉井 伸岳 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

(受取日:2014年2月10日,受理日:2014年4月14日)

Temperature- and Pressure-Induced Phase Transitions of Saturated Diacylphosphatidylcholine Bilayer Membranes

Hitoshi Matsuki, Masaki Goto, and Nobutake Tamai Department of Life System, Institute of Technology and Science, The University of Tokushima

(Received Feb. 10, 2014; Accepted Apr. 14, 2014)

Temperature- and pressure-induced bilayer phase transitions of a series of diacylphosphatidylcholines containing two equivalent linear saturated acyl chains (CnPC: n = 12 - 22) were comprehensively revealed by constructing the temperature (T) – pressure (p) phase diagrams and determining thermodynamic quantities of the phase transitions, which were obtained by combined methods of differential scanning calorimetry under atmospheric pressure and light-transmittance measurements under high pressure. The T-p phase diagrams clarified various interesting aspects of the phase behavior, e.g., polymorphism between the gel phases, change in the gel-phase stability and pressure-induced bilayer interdigitation. Especially, the interdigitation was found to be induced in bilayers of CnPCs for 14 to 21. It turned out from the thermodynamic quantities that the sub-, pre- and main transition are, respectively, an acyl chain-length dependent transition with slow kinetics, an acyl chain-length independent transition with fast kinetics and an acyl chain-length dependent transition with fast kinetics, respectively. The interaction between CnPC molecules in the bilayer membrane was also deduced from the systematic consideration on the bilayer phase transitions of CnPCs.

Keywords: bilayer membrane, diacylphosphatidylcholine, high pressure, interdigitation, phase transition, thermodynamic quantity.



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



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



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

1. はじめに

ホスファチジルコリン (PC) は真核生物の生体膜に多量 に含まれるグリセロリン脂質である。真核生物の生体膜中 に含まれる大部分の PC は 2 本のアシル鎖の一つが二重結 合を含む不飽和脂肪酸鎖である非対称型脂質であるにも関 わらず,2本の等価な飽和脂肪酸鎖を有する対称型飽和ジ アシル PC (CnPC) が形成する二重膜が様々な生命科学研 究において頻用されている。CnPC の使用は実際の生体膜 組成から遠ざかる反面、モデル膜研究には有用であり、そ の単純化した分子構造は脂質膜内における分子間相互作用 の理解を助ける。過去より、CnPC を用いたモデル研究に は、主に炭素数14のミリスチン酸や炭素数16のパルミチ ン酸を疎水アシル鎖として有するジミリストイル PC (C14PC (DMPC)) やジパルミトイル PC (C16PC (DPPC)) が用いられてきた。これは両者の形成する二重膜のゲルー 液晶相転移温度(DMPC約24°CおよびDPPC約42°C)が, 室温や哺乳動物の体温(37-40°C)の近傍にあるため,膜 の構造変化検出が実験的に容易であることが一因である。

リン脂質二重膜の相転移は示差走査熱量(DSC)測定で 精度よく検出することができる。CnPC 二重膜の DSC 測定 については、Sturtevant らの研究¹⁾以来、Lewis らの系統的 研究²⁾ や児玉らによる DMPC や DPPC 二重膜の精密熱測 定^{3,4)}といった優れた研究がある。我々も、これまで CnPC 二重膜の常圧下における膜状態を DSC 測定で調査してい るが,我々は熱測定に加えて高圧力測定を行っている。圧 力の使用により導入される長所は以前に本誌の解説⁵⁾に述 べたので、そちらを参照していただきたいが、圧力が二 二重 膜にもたらすメカニカル(力学的)変化は、温度変化(上 昇)の拮抗化だけでなく,脂質二重膜に対して高圧力下で のみ存在しうる新規な膜状態や体積変形に基づいた形態変 化をもたらすことを強調しておく。本解説においては,我々 がこれまでに熱測定に加えて高圧力測定で明らかにしてき た一連の CnPC (C12-C22) が形成する二重膜の相転移 6-11) を,常圧下のDSC サーモグラム,温度-圧力相図および相 転移熱力学量を用いて総括的に説明する。

2. CnPC 二重膜の熱的相挙動

CnPC の分子構造を Fig.1(a)に示す。CnPC はグリセロールを基本骨格にし、その1位と2位には同じ鎖長の飽和脂肪酸が脱水縮合し、3位にはかさ高い極性基であるコリン基がリン酸を介して脱水縮合している。本稿では、炭素数12のラウリン酸をアシル鎖として有する C12PC から炭素数を一つずつ伸長させ、炭素数22のベヘン酸を有する C22PC までの合計 11 個の CnPC を取り上げる。C12PC, C16PC, C22PC のゲル相における立体構造(Fig.1(b))からわかるように、これら3種類の CnPC のアシル鎖長は顕著に異なっている。CnPC のアシル鎖炭素数の逐次増加による鎖間の疎水性相互作用(van der Waals 力)の増大が CnPC 二重膜の膜状態におよぼす影響を系統的に論ずる。

CnPC 二重膜の示す相転移は水分含量に依存して変化す るが、含水率が50%以上では、水分含量にはほとんど依存 しない。³⁾ 熱量測定とX線測定では使用する脂質濃度に、 通常、数10倍以上の差違があるが、観測しうる相状態は同 じである。DSC測定では、通常、脂質濃度1-5 mmol kg⁻¹ 程度(含水率99%以上)の試料を用いて、脂質分子極性頭 部に完全に水が水和した条件下で測定が行われる。Fig.2 に C16PC 二重膜に対してなされた DSC 測定の結果と温度に 依存して取りうる膜状態を示す。¹²⁻¹⁴ 昇温に伴い DSC サ ーモグラム上に三つの吸熱ピークが観測され、C16PC 二重



Fig.1 (a) Molecular structure of PC. (b) Three-dimensional pictures of C12PC, C16PC, and C22PC from the top.

膜は、常圧下、4 種類の膜状態(サブゲル(L_c)相、ラメ ラゲル($L_{\beta'}$)相、リップルゲル($P_{\beta'}$)相および液晶(L_a) 相)をとる。ここで、プライム"'"は、鎖が二重膜に対 して傾斜していることを表す。低温から順に起こる L_c 相と $L_{\beta'}$ 相間、 $L_{\beta'}$ 相と $P_{\beta'}$ 相間および $P_{\beta'}$ 相と L_{α} 相間の転移をそれ ぞれ副転移、前転移および主転移と呼んでいる。¹⁵⁾

低温状態における最安定相の L_c相は,水和した結晶相で あり,脂質のアシル鎖は全てトランス型のジグザグ配座で 秩序性の高い膜状態である。L_c相では,二重膜内の脂質分 子のアシル鎖は規則的に充填し,長軸回りの回転が著しく 制限されており,極性頭部の水和水は少ない。CnPC 二重 膜を L_c相に移行させるためにはアニーリングと呼ばれる 熱的な前処理が必要とされるため,^{2,13)} 1回目の昇温後に降 温し,すぐに実施した2回目の昇温過程の DSC サーモグラ ム上に副転移は観測されない。副転移は,主に脂質分子極 性頭部における水分子の水和状態に関連した転移であるが, 後述するようにアシル鎖長にも依存する。温度上昇に伴い L_c相から転移した L_p相では,鎖は L_c相と同様にすべてト ランス型であるが,長軸回りの回転が可能となる。この運 動の自由度の増加に伴い,特に CnPC 二重膜のゲル相では 多形構造が出現する。ゲル相多形構造間の転移が前転移で



Fig.2 DSC thermograms of C16PC bilayer and schematic illustrations of membrane structures of each phase.

ある。前転移は平面形状の二重膜(L_β相)から波型形状の 二重膜(P_β相)への変化に対応する。PCの有する大きな極 性頭部はその立体障害により二重膜形成に際して疎水鎖の 密な集合の妨げとなる。ゲル相状態では、疎水鎖が膜面の 法線から約 30 度傾斜することで鎖間の安定距離が保たれ ている。膜内におけるこの傾斜配向は CnPC 二重膜の特徴 の一つである。さらなる温度上昇で,P_β相は L_α相へ転移す る。この相転移はアシル鎖の融解現象である。L_α相では疎 水鎖の配座に回転異性体のゴーシュ型が増すため,鎖はゆ らぎ,秩序性の低い膜となり膜の流動性が増大する。加え て二重膜間の水和も増加する。

Fig.3(a), (b)に C12PC から C22PC が形成する二重膜に冷 蔵冷凍を繰り返すアニーリング処理(我々は動的アニーリ ング処理と呼んでいる)^{2,16)}を施した後に昇温することで 得られた DSC サーモグラムを示す。適度なアニーリング処 理により L_c相を形成させることができ、C13PC から C19PC までの CnPC 二重膜において L_c相からゲル相への副転移を 観測することができる。2 回目の昇温過程の熱挙動(デー タ非掲載)との比較から、C13PC と C14PC の二重膜は L_c 相から P_β相への副転移を起こし、⁹C15PC から C20PC まで の二重膜は L_c相から L_β相への副転移を起こすことが明ら かとなった。^{9,11)} C13PC と C14PC の二重膜では、L_{β'}相は 準安定相として出現するが,炭素数15以上の鎖長を有する CnPC の二重膜では、Lg'相は安定相として出現する。鎖長 の短い C12PC の二重膜では, 主転移が水の融解ピークと重 なり、観測が困難となる。我々は水の凝固を回避するため 50 %エチレングリコール (EG) 水溶液中で C12PC 二重膜 の相挙動観測を行った。C12PC二重膜では、アニーリング 処理により、主転移は観測されず、副転移様の大きな吸熱 ピーク(Fig.3(a)の曲線1の大きなピーク)が出現する。こ の転移はL_c相からゲルと液晶の中間(L_x)相への転移に対 応している。¹⁷⁾この転移後、L、相はL。相へ転移する。他方、 アシル鎖炭素数 20 以上の CnPC 二重膜の場合,長期間のア ニーリング処理を実施したとしても完全に L。相に落とし 込むことが甚だ困難である。我々が実施したアニーリング 期間(約1年間)でさえも C20PC や C21PC の二重膜では 副転移の観測はできなかった。11) Lewis らは1年4ヶ月程 のアニーリングで C21PC 二重膜の副転移を漸く観測できたことを報告しているが、²⁾ それでもその相転移エンタル ピー (ΔH) 値は C19PC 二重膜と比較してかなり小さく, この条件でもL_c相は完全には形成されていない。

前転移は、C13PC二重膜ではL_β相が水の凝固点近傍まで



Fig.3 (a) DSC thermograms of *CnPC* bilayers: (1) C12PC, (2) C13PC, (3) C14PC, (4) C15PC, (5) C16PC, (6) C17PC. (b) DSC thermograms of *CnPC* bilayers: (1) C18PC, (2) C19PC, (3) C20PC, (4) C21PC, (5) C22PC. All lipid samples were annealed by repeating thermal cycling to form the L_c phase. The thermogram of the C12PC bilayer was obtained in 50 % EG solution.

準安定状態で存在するため、その観測が難しいが、C14PC 二重膜からは全ての CnPC 二重膜において観測できる。前 述したように L_p相は C15PC 二重膜から安定相となるので、 これ以上の鎖長の CnPC 二重膜では脂質試料の熱履歴に関 わらず、常に出現する。C22PC 二重膜では L_p相は非二重膜 構造のゲル相(後述する L_pI 相)に置き換わるので、 10 そ の場合の前転移は L_p相から P_p相への転移ではなく、非二 重膜ゲル相から P_b相への転移である。

アシル鎖の融解転移である主転移に関しては、全ての CnPC 二重膜において P_{β} 相と L_{α} 相間に転移として観測され る。副転移、前転移および主転移の吸熱ピークは、完全に L_{c} 相へ移行していない C20PC の副転移を除き、全て鎖長の 伸長と共に高温領域へ移行する。特に主転移の吸熱ピーク には明瞭な鎖長依存性が見られ、その吸熱ピークは鎖長伸 長と共に大きくなる。⁶

3. CnPC 二重膜の温度-圧力相図

我々はこれまでに圧力を変数に加えて CnPC 二重膜の相 挙動を調査してきた。高圧力下においては、相転移前後で 二重膜ベシクルの屈折率が変化することを利用して、光学 的に相転移温度を圧力の関数として決定している。光透過 率測定は DSC 測定とは逆に濃度が低い方が精度よく相転 移をとらえることができる。このようにして決定した主転 移温度の圧力依存性(主転移曲線)とゲル相間転移温度の 圧力依存性(前転移曲線およびゲル相間転移曲線)に基づ いたCnPC二 「重膜の温度(T)−圧力(p)相図を以前の解説 で示した。18,19) ここではさらにアシル鎖長を拡張した C12PC から C22PC までの 11 種類の二重膜に対し, 副転移 の圧力依存性(副転移曲線)も含めた完全な CnPC 二重膜 の T-p 相図を Fig.4 に示す。加圧は体積を減少させ、分子 間距離を狭めることから二重膜内の PC 分子間の相互作用 を強める。従って、常圧下で観測された3種類の相転移温 度は加圧により上昇する。高圧力下における CnPC 二重膜 の相挙動の大きな特徴は、アシル鎖炭素数14以上のCnPC が形成する二重膜は圧力誘起の新しいゲル相が出現するこ とである。20) このゲル相は、向き合う二分子膜の各単分子 層が疎水鎖を互いに貫入させて単分子膜程度の厚さになっ た非二重膜であり、指組み構造ゲル(L_bI)相と呼ばれる

(Fig.4 右下図)。圧力誘起 $L_{\beta}I$ 相はアシル鎖炭素数 14 から 21 まで CnPC 二重膜において形成される。圧力誘起された $L_{\beta}I$ 相はさらなる加圧により、その領域を拡張する。



Fig.4 Temperature–pressure phase diagrams of *CnPC* bilayers: (a) C12PC, (b) C13PC, (c) C14PC, (d) C15PC, (e) C16PC, (f) C17PC, (g) C18PC, (h) C19PC, (i) C20PC, (j) C21PC, (k) C22PC. Phase transitions: (\Box) subtransition, (Δ) pretransition and transitions between gel phases, (\circ) main transition. The diagram of the C12PC bilayer was obtained in 50% EG solution. Broken lines indicate transitions between metastable phases. The lowest right illustration represents the L_βI phase of C16PC membrane.

Netsu Sokutei 41 (2) 2014

説

アシル鎖炭素数 14 以上の CnPC が形成する二重膜の T-p 相図は主転移曲線、前転移曲線およびゲル相間転移曲線の 挙動は定性的に類似している。これに対して、副転移曲線 はアシル鎖長に依存して前転移曲線およびゲル相間転移曲 線と交差するため、複雑な相挙動をもたらす。C12PC 二重 膜は常圧から 40 MPa までの低圧領域では、主転移曲線が 副転移曲線よりも低温側に位置し、40 MPa で両曲線は交差 し、それ以上の高圧領域では主転移曲線が副転移曲線より も高温側に位置する。これは常圧から 40 MPa までの低圧 領域では、副転移は L_c/L_x 転移として観測され、それ以上 の圧力ではL_c/P_B転移として観測されることを意味する。さ らに常圧から180 MPa付近までは最高温側においてL_x相か らL_α相への相転移を起こす。C13PC二重膜においては、副 転移曲線は全圧力範囲で主転移曲線と前転移曲線の間に位 置し、これはLg相が全圧力範囲で準安定状態であることに 対応している。C14PC 二重膜では、常圧下では副転移温度 が前転移温度よりも高温側に位置しているが, 高圧力下, 23 MPa 近傍で副転移曲線は前転移曲線と交差し, さらに高 圧領域(307 MPa)で再びゲル相間(L_β/L_βI)転移曲線と交 差する。2 つの交差点間の圧力範囲では前転移曲線が副転 移曲線よりも高温領域に位置することから、この圧力範囲 では L_B相は安定相となる。C15PC 二重膜の場合, C14PC 二重膜とは逆の状況となる。すなわち、常圧下では前転移 温度が副転移温度よりも高温側に位置するが,高圧力下, 68 MPa 近傍で副転移曲線は前転移曲線と交差し、さらに高 圧領域(189 MPa)で再びゲル相間(L_βI/P_β)転移曲線と交 差する。2 つの交差点間の圧力範囲では副転移曲線が前転 移曲線よりも高温領域に位置することから、この圧力範囲 では L_B相は準安定相である。このように C14PC と C15PC の二重膜の主転移温度以下の相挙動は複雑である。9)他方, アシル鎖炭素数 16 から 20 までの CnPC の二重膜では,副 転移曲線の挙動はほぼ類似している。これらの CnPC 二重 膜では、常圧下、副転移温度は前転移温度よりもかなり低 温に位置することから、全圧力範囲でLg/相は安定相として 存在できる。加圧により副転移温度は上昇し、副転移曲線 は高圧力下でゲル相間(L_β/L_βI)転移曲線とのみ交差する。 従って、L_B相は常圧からその交差点圧力までは安定相とな る。交差点以上の高圧領域では、アニーリングした試料は $L_c/L_{\beta}I$ 転移が,未処理試料は $L_{\beta'}/L_{\beta}I$ 転移が起こる。¹¹⁾

全ての相図中で,唯一,L_β/L_βI転移曲線のみが負の傾き を持っているのがわかる。C14PC, C15PC および C16PC の 二重膜ではその傾きは負のままであるが,アシル鎖炭素数 が 17 から 21 までの CnPC 二重膜では、さらなる高圧力下 ではその傾きが負から正へと符号を反転させ、Lg/LgI 転移 曲線に極小値が生じている。二相境界線の傾き(dT/dp)は Clapeyron の式 $(dT/dp = \Delta V/\Delta S = T\Delta V/\Delta H)$ で近似できる。 $L_{\beta'}L_{\beta}I$ 転移は正の ΔH 値を与えるので、 $L_{\beta'}L_{\beta}I$ 転移の dT/dp 値が負になることは、この転移の体積(ΔV)が負値となる こと、すなわち L_BI 相のモル体積が L_B相のモル体積よりも 小さいことに起因する。^{18,19)}実際,このΔV値が負値である ことが比容測定により実証されている。²¹⁾加圧により dT/dp 値の符号が反転することは、ΔV が負から正に転ずることを 示唆する。これは、低圧側では L_βI 相の部分モル体積が L_β 相のものよりも小さいが、主に圧縮率の違い(L_gI相の圧 縮率が小さいため、L_b相よりも圧縮されにくい)のため、 高圧側ではL_bI相の部分モル体積がL_b相のものよりも大き くなることに起因する。さらに極小値はアシル鎖長の増加 により低圧領域に移行することから, Lg,相の圧縮率が鎖長 依存的に小さくなっていくことが伺える。

CnPC 二重膜の T-p 相図の相挙動を,相図を重ね合わせることで系統的に比較してみる。¹¹⁾ Fig.5(a)に C14PC から

C18PC の二重膜の主転移曲線,前転移曲線およびゲル相間 転移曲線の挙動を重ね合わせた相図を,Fig.5(b)に C19PC から C22PC の二重膜の対応する相図を示す。CnPC 二重膜 の T-p 相図中の相境界線がアシル鎖長の増加に伴い左上の 高温・低圧領域へと移動していくのがわかる。アシル鎖伸 長に伴う脂質分子間相互作用の増大による相転移温度の上 昇が加圧による相転移温度の上昇と相乗し,L_p相をより安 定化するため,特に主転移曲線と前転移曲線はアシル鎖長 と共に段階的に高温領域へ移行する。

他方,アシル鎖長の増加は $L_{\rho I}$ 相の領域を低圧領域へと 顕著に拡張する。ここで,各 CnPC 二重膜の T-p 相図中に おける 3 つのゲル相 (L_{ρ} , P_{ρ} , $L_{\rho I}$)の三相共存点に着目す る。この三重点を指組み構造化点として定義すると, $L_{\rho I}$ 相はこの三重点の圧力以上の圧力範囲で形成されるこ とから,この三重点圧力は最小指組み構造化圧力 (Minimum



Fig.5 (a) Superposed temperature–pressure phase diagrams of CnPC bilayers: (1) C14PC, (2) C15PC, (3) C16PC, (4) C17PC, (5) C18PC. (b) Superposed temperature–pressure phase diagrams of CnPC bilayers: (1) C19PC, (2) C20PC, (3) C21PC, (4) C22PC. Phase transitions: (\triangle) pretransition and transitions between gel phases, (\bullet) main transition.

interdigitation pressure: MIP) となる。⁹⁾ 各 CnPC 二重膜の T-p相図中で決定されたMIP値のアシル鎖長依存性をFig.6 に示す。MIP 値はアシル鎖の伸長と共に双曲線的に減少し, 疎水鎖間の凝集力が増すと低い圧力で L_gI 相が誘起される ことがわかる。また, C22PC が形成する二重膜では MIP 値 はほぼ0となる。この結果はC22PC二重膜では、加圧する こと無く、常圧下、水和のみで L_βI 相を形成することを示 唆する。我々は C22PC 二重膜に対して,常圧下における小 角中性子散乱測定と高圧下における蛍光測定から、C22PC 二重膜の低温ゲル相は L_BI 相であることを実証した。¹⁰⁾従 って、L_RI相形成に圧力を必要とするのはC21PC二重膜ま でである。他方,短いアシル鎖長ではMIP値は大きくなり, C14PC 二重膜では約 300 MPa となる。我々は以前に指組み 構造化点における温度と圧力(MIP)を用いて、圧力誘起 指組み構造形成を体積的な観点から考察し、C13PC 二重膜 では圧力誘起指組み構造形成は、実質的には起こりえない ことを示した。⁷⁾ 従って, CnPC 二重膜の圧力誘起指組み構 造形成にはアシル鎖長の上限と下限が存在し、C14PCから C21PC までの8種類のCnPC が形成する二重膜のみが圧力 誘起 L_BI 相を形成する。

Fig.7 には C13PC から C20PC の二重膜の副転移曲線の挙 動を重ねた相図を示す。ここで、C13PCとC14PCの二重膜 は、低圧力下では L_c相から P_B相への副転移であり、それ らの高圧力下およびその他の CnPC 二重膜は L_c相から L_n 相への副転移である。前者の副転移曲線の dT/dp 値は相転 移の種類が完全に同じでないためか、後者の副転移曲線の ものよりも少し小さい。また、C20PC 二重膜の常圧下にお ける副転移温度が C19PC 二重膜よりも小さく, dT/dp 値も 大きくなっているが、これは前述したように C20PC 二重膜 に対しては完全に L_c相を形成した状態を得られていない ことに起因する。アシル鎖長の増加に伴い、副転移曲線も 高温領域に移行し、L。相の領域を拡張することから、二重 膜内の脂質分子間相互作用の増大はより安定な L_c相を形 成する方向へ作用することが理解できる。また、副転移曲 線の挙動を Fig.5 の主転移曲線,前転移曲線およびゲル相 間転移曲線のものと比べてみると、アシル鎖長増加により 主転移曲線、前転移曲線およびゲル相間転移曲線は顕著に 高温領域に移行するが、副転移曲線の移行の度合いはそれ らに比べて小さい。結果, C14PC や C15PC の二重膜におい



Fig.6 Minimum interdigitation pressure of CnPC bilayers as a function of acyl chain length.



Fig.7 Pressure dependence of subtransition temperatures for CnPC bilayers: (1) C13PC, (2) C14PC, (3) C15PC, (4) C16PC, (5) C17PC, (6) C18PC, (7) C19PC, (8) C20PC.

ては、前者の曲線と副転移曲線の配置順序がある圧力範囲 で逆転を起こす状況となり、これら二重膜の相挙動が複雑 になる。アシル鎖長 16 以上の CnPC 二重膜では、前者の曲 線と副転移曲線の差が開いていくので、相挙動は類似する。 また、C20PC 二重膜では副転移曲線と L_p/L_pI 転移曲線は接 触するような形で交差していることから、C21PC 二重膜の 副転移曲線を描くことができれば、C20PC 二重膜同様に L_p/ 相に加えて L_pI 相も全圧力範囲で安定相として存在するも のと推察される。¹¹⁾

4. CnPC 二重膜の相転移熱力学量

常圧下における DSC 測定から相転移に伴う熱的諸量(転移温度, ΔH , エントロピー (ΔS)) が得られる。他方,高 圧光透過率測定により dT/dp 値を決定できるので, Clapeyron の式に ΔH と dT/dp の両値を代入することにより ΔV 値が求められる。このようにして決定した 11 種類の CnPC 二重膜の大気圧下における相転移熱力学量を各転移 別に分類し, Table 1 (主転移), Table 2 (前転移) および Table 3 (副転移) にまとめた。⁶⁻¹¹⁾ また, Fig.8 にはこれら 3 種類の相転移における三つの熱力学量, 転移温度, ΔH , ΔV の値のアシル鎖長依存性を図示する。¹¹⁾

アシル鎖長の増加に伴い,3 種類の相転移温度は上昇す るが、副転移温度の上昇度合いは主転移温度と前転移温度 のものより小さい。主転移温度と前転移温度の温度差はア シル鎖長と共に小さくなり,鎖長22でほぼ0となる。但し、 前転移は C21PC までは L_{p}/P_{p} 転移であるが、C22PC では $L_{p}I/P_{p}$ 転移となる。これに対して、副転移温度は鎖長14と 15を境にして前転移温度と逆転が起こるため、常圧下、鎖 長14以下の CnPC 二重膜では、 L_{p} 相は準安定相となる。さ らに、副転移温度は主転移温度と鎖長12と13を境にして 逆転する。すなわち、鎖長13以上の CnPC 二重膜では L_{c} 相からゲル相 (P_{p} 相 (鎖長13および14)あるいは L_{p} 相 (鎖 長15以上))に転移するが、鎖長12の C12PC 二重膜では ゲル相自体が準安定相になり、 L_{c} 相から L_{α} 相へ直接転移す る。しかし、C12PC 二重膜では L_{x} 相が出現するため、その 転移は観測されず、 L_{c}/L_{x} 転移に置き換わる。²⁾ 50% EG 中 では主転移より高温側に大きな熱力学量変化を伴う L_c/L_x 転移を明瞭に観測することができる。¹⁷⁾

Table 1 Thermodynamic properties of main $(P_{\beta'}/L_{\alpha})$ transition for *CnPC* bilayer membranes.

Lipid	Т	dT/dp	ΔH	ΔS	ΔV
	(°C)	(K MPa ⁻¹)	(kJ mol ⁻¹)	$(J K^{-1} mol^{-1})$	$(cm^3 mol^{-1})$
C12PC	-2.3	0.20	7.5	28	5.5
C13PC	13.6	0.21	16.0	56	11.7
C14PC	24.0	0.21	25.7	87	18.3
C15PC	34.0	0.22	33.1	108	23.2
C16PC	42.0	0.22	36.4	116	25.4
C17PC	48.6	0.22	41.4	129	28.8
C18PC	55.6	0.23	45.2	137	31.6
C19PC	60.5	0.24	46.1	138	33.2
C20PC	65.1	0.26	48.7	144	37.4
C21PC	69.6	0.27	55.1	161	42.8
C22PC ^a	73.4	0.25	65.4	189	47.9

^a $L_{\beta}I/L_{\alpha}$ transition.

Table 2 Thermodynamic properties of pre- $(L_{\beta'}/P_{\beta'})$ transition for CnPC bilayer membranes.

Lipid	Т	dT/dp	ΔH	ΔS	ΔV
	(°C)	(K MPa ⁻¹)	(kJ mol ⁻¹)	$(J K^{-1} mol^{-1})$	$(cm^3 mol^{-1})$
C12PC	-	_	_	-	-
C13PC	-0.8 ^a	0.14	2.1	8	1.1
C14PC	14.9	0.13	4.5	16	2.0
C15PC	24.7	0.12	4.4	15	1.8
C16PC	34.3	0.13	4.6	15	2.0
C17PC	42.9	0.13	4.6	15	1.9
C18PC	50.9	0.14	5.0	15	2.2
C19PC	56.6	0.17	5.0	15	2.6
C20PC	63.2	0.15	4.3	13	1.9
C21PC	67.9	0.18	5.7	17	3.0
C22PC	-	_	_	_	-

^a Lewis, at el.²

Table 3 Thermodynamic properties of sub- (L_c/L_{β}) transition for CnPC bilayer membranes.

Lipid	Т	dT/dp	ΔH	ΔS	ΔV
	(°C)	(K MPa ⁻¹)	(kJ mol ⁻¹)	$(J K^{-1} mol^{-1})$	$(cm^3 mol^{-1})$
C12PC ^a	1.7	0.12	32.9	120	14.0
C13PC ^b	12.9	0.12	17.5	61	7.3
C14PC ^b	17.1	0.08	25.7	89	7.1
C15PC	20.5	0.16	25.0	85	13.6
C16PC	21.5	0.18	26.3	89	16.1
C17PC	25.0	0.16	27.2	91	14.6
C18PC	31.0	0.22	28.6	94	20.7
C19PC	35.4	0.22	26.8	87	19.1
C20PC	32.7	0.25	11.2	37	9.2
C21PC	_	_	_	_	_
C22PC	-	_	_	_	_

^a L_c/L_x transition in 50% EG solution, ^b L_c/P_β ' transition.

CnPC二重膜の主転移は、全て P_{β} 相と L_{α} 相間の転移であ り,その熱力学量 (ΔH およびΔV)の値は共にアシル鎖長 と共に大きくなる。長鎖化合物の融点や融解熱は鎖長が増 すと増大することから, 主転移はリン脂質二重膜における 鎖融解現象として理解できる。主転移熱力学量はΔH とΔV の値共にアシル鎖長増加に伴い非直線的に増加しているが, CnPC 分子の2本のアシル鎖の寄与が不均一である先端部 と末端部の寄与を取り除いた変数(Perturbation parameter) に対してプロットしてみると, 11,22) 鎖長 12 から 21 までの アシル鎖範囲でほぼ直線性が成り立つので(データ非掲載), 主転移熱力学量へのメチレン基当たりの寄与はほぼ等価で あると言える。また、このプロットの短鎖長への外挿値は アシル鎖長11で0となることから、主転移は鎖長12以上 の CnPC 二重膜から起こる相転移である。6 C22PC 二重膜 においては、ΔH とΔV の値共に曲線から外れているが、こ れは、主転移の吸熱ピークに前転移(L_gI/P_g・転移)の吸熱 ピークが包含されており、両転移のピーク分離が困難であ



Fig.8 (a) Phase-transition temperatures, (b) enthalpy change (ΔH) and (c) volume change (ΔV) of *CnPC* bilayers as a function of acyl chain length: (\bigcirc) main transition, (\triangle) pretransition, (\Box) subtransition. Closed square refers to ΔH value for L_c/L_x transition of C12PC bilayer.

Netsu Sokutei 41 (2) 2014

るため, ΔH 値は両者込みの値, すなわち $L_{\beta}I/L_{\alpha}$ 転移として 与えてあることに起因する。

前転移に関するΔ*H* とΔ*V* の値は3 種類の転移の中で極め て小さく,アシル鎖長依存性もほとんど認められない。 L_{β}/P_{β} 転移では,転移の前後の膜状態におけるアシル鎖は全 てトランス型配座(鎖は伸びたままでまっすぐ)で親水基 頭部のパッキングが変化するため鎖長にはほとんど依存し ない。^{18,19} 小さな熱力学量変化は,この変化は小さなエネ ルギーで起こることを示唆している。

副転移の ΔH と ΔV の値については, 主転移程ではないが, 両者共に比較的に大きな値をとり、それらの値にもアシル 鎖長依存性が見られる。これまで副転移は、主に PC 分子 の極性頭部の水和状態変化に関連していると考えられてお り、児玉らによる PC 二重膜の氷の融解ピークの精密解析 からは、C16PC 二重膜の場合、約 10 個の層間水中におけ る不凍結層間水と凍結層間水の比率が副転移において変化 する(L_c/L_n/転移に伴い、1個の不凍結層間水が凍結層間水 になる)ことが明らかにされている。4,23) 一方で,極性頭 部の水和変化のみでは、かなり大きな副転移熱力学量の値 とそのアシル鎖長依存性を説明することができない。最近, 我々は2本のアシル鎖の長さが異なる非対称 PC 脂質は, CnPC が形成する二重膜よりも格段に早く、L。相に落ち込 み、且つその形成は加圧によりさらに加速されることから L_c相研究に適することを見出した。24) この非対称 PC 脂質 二重膜の L。相の挙動を高圧蛍光測定で調べてみたところ, PC 分子の L_c相中における配向は、二重膜表面に対して隣 合う PC 分子の極性頭部が平行ではなく、極性頭部が互い 違いに上下に配置したスタッガード(千鳥状)構造(Fig.2 参照)を取っている可能性が示唆された。PC はリン酸基に 負電荷を、コリン基の窒素原子に正電荷を有する分子内中 性の脂質である。L。相中で,このような分子配向を取れば, 副転移の比較的大きな熱力学量は隣合う PC 分子間の静電 的な相互作用に起因するものとして解釈でき、またその相 互作用は疎水鎖長にも依存することが説明できる。

5. おわりに

脂質二重膜研究において, DSC 測定は温度誘起相転移検 出法の一つとして確立されている重要な実験手段である。 我々はこの熱測定による温度実験に加え, 圧力を実験変数 として導入して圧力誘起相転移実験を実施し、多くの情報 を得ている。さらに、脂質分子のアシル鎖長効果の系統的 調査は、脂質膜研究に疎水性相互作用を変数として加える ことを可能にする。疎水性相互作用は脂質二重膜形成の駆 動力であり、その相転移現象は元来、疎水性相互作用に基 づいている。疎水性相互作用の増加は、脂質分子の分子間 相互作用(凝集性)を強めるので、定性的には、温度には 拮抗し、圧力には相乗した効果が期待される。しかし、一 般に脂質二重膜の環境変数感受性は非等方的であり、例え ば、ゲル-液晶転移(主転移)においてはアシル鎖上へのゴ ーシュ型配座の導入により縦方向には小さくなり(膜厚縮 小)、横方向には大きくなる(膜面積拡張)。従って、疎水 性相互作用の変化はさらに膜状態の複雑化をもたらす。

本稿では、飽和アシル鎖を持つ同族体のリン脂質 CnPC が形成する二重膜が温度と圧力に依存して誘起する相転移 をアシル鎖長の関数として述べた。CnPC 二重膜の T-p 相 図と熱力学量の系統的な変化からは、疎水性相互作用に支 配された複雑な CnPC 二重膜の挙動を明確に規定できるの と同時に、二重膜内で作用する脂質分子間相互作用が見え てくる。近年、我々は高圧力下における蛍光測定から CnPC 二重膜中の脂質分子充填状態についてのイメージング解析 を行い, 膜内疎水性相互作用に関して有用な情報を得ている。^{25,26)}本稿と同様な系統的実験に基づくものであるが, これについては別の機会に紹介したい。

謝 辞

本稿は徳島大学 金品 昌志名誉教授の研究室のもとで行われてきた研究成果を,近年,新たに得た長鎖 CnPC の二 重膜の成果と共に総括的に論じたものである。CnPC 二重 膜の T-p 相図の構築にはこれまで数多くの卒業生および修 了生に携わってもらった。ここに感謝の意を表したい。

文 献

- S. Mabrey and J. M. Sturtevant, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3862-3866 (1976).
- R. N. A. H. Lewis, N. Mak, and R. N. McElhaney, Biochemistry 26, 6118-6126 (1987).
- 3) M. Kodama, Thermochim. Acta 109, 81-89 (1986).
- 4) H. Aoki and M. Kodama, *Thermochim. Acta* **308**, 77-83 (1998).
- 5) 松木 均, 金品昌志, 熱測定 33, 74-82 (2006).
- 6) H. Ichimori, T. Hata, T. Yoshioka, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Chem. Phys. Lipids* **89**, 97-105 (1997).
- H. Ichimori, T. Hata, H. Matsuki, and S. Kaneshina, Biochim. Biophys. Acta 1414, 165-174 (1998).
- M. Goto, M. Kusube, N. Tamai, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 1067-1078 (2008).
- 9) M. Goto, S. Ishida, N. Tamai, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Chem. Phys. Lipids* 161, 65-76, (2009).
- M. Goto, A. Wilk, A. Kazama, S. Chodankar, J. Kohlbrecher, and H. Matsuki, *Colloids Surf. B: Biointerf.* 84, 44-48 (2011).
- 11) M. Goto, T. Endo, T. Yano, N. Tamai, and H. Matsuki, in press.
- 12) S. C. Chen, J. M. Sturtevant, and B. J. Gaffney, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5060-5063 (1980).
- M. Kodama, H. Hashigami, and S. Seki, J. Colloid Interface Sci. 117, 497-504 (1987).
- 14) M. Kusube, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Biochim. Biophys. Acta* 1668, 25-32 (2005).
- 15) R. N. A. H. Lewis and R. N. McElhaney, *The Structure of Biological Membranes*, 2nd ed., ed. by P. L. Yeagle. 57–60 (2005), CRC Press, New York.
- 16) S. Tanaka, N. Tamai, M. Goto, S. Kaneshina. H. Matsuki, *Chem. Lett.* **41**, 304-306 (2012).
- 17) K. Tada, M. Goto, N. Tamai, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Chem. Phys. Lipids* **153**, 138-143, (2008).
- 18) 金品昌志,松木均,一森勇人,高圧力の科学と技術9, 213-220 (1999).
- 19) 金品昌志, 松木 均, 生物物理 40, 94-98 (2000).
- 20) L. F. Braganza and D. L. Worcester, *Biochemistry* 25, 2591-2596 (1986).
- 21) K. Ohki, K. Tamura, and I. Hatta, *Biochim. Biophys. Acta* **1028**, 215-222 (1990).
- 22) J. T. Mason and C. H. Huang, Lipids 16, 604-608 (1981).
- 23) M. Kodama and H. Aoki, *Recent. Res. Dev. Biophys. Chem.* 1, 27-40 (2000).
- 24) M. Goto, A. Wilk, K. Kataoka, S. Chodankar, N. Tamai, M. Fukui, J. Kohlbrecher, H. Ito, and H. Matsuki, *Langmuir* 28, 12191-12198 (2012).
- 25) H. Matsuki, M. Goto, M. Kusube, and N. Tamai, Bull. Chem. Soc. Jpn. 84, 1329-1335 (2011).
- 26) 後藤優樹, 高圧力の科学と技術 23, 157-166 (2013).