

解 説

## 脂質の相転移と結晶化

上野 聡<sup>a</sup>, 高橋 浩<sup>b</sup>

<sup>a</sup> 広島大学大学院生物圏科学研究科

<sup>b</sup> 群馬大学大学院理工学府

(受取日: 2014年5月22日, 受理日: 2014年6月17日)

### Phase Transition and Crystallization of Lipids

Satoru Ueno<sup>a</sup> and Hiroshi Takahashi<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University

<sup>b</sup> Graduate School of Science and Technology, Gunma University

(Received May 22, 2014; Accepted June 17, 2014)

Lipids are the major substance in biological membrane. They also make an important role for industrial applications such as food, pharmaceutical and cosmetics. Here, we have reviewed the physical chemistry of lipids, especially, highlighted to triacylglycerols (TAGs) and phospholipids. In the TAGs part, the thermal and structural properties of PPP and POP, the typical TAGs, have been focused on. The complicated polymorphism is present in TAGs. In order to determine polymorphs, time-resolved synchrotron radiation X-ray diffraction measurement and differential scanning calorimetry (DSC) under the same conditions, simultaneous or even though not simultaneous, is effective. As for phospholipid part, at first, the type of phospholipid and relationship between phospholipid and bio-membrane has been introduced. Secondly, crystal structure of phospholipid has also been introduced. Thirdly, the polymorphism and phase transitions of phospholipids under excess water, namely hydrated membrane state, have been highlighted. DSC data and its analysis, transition temperature, transition enthalpy and conformation entropy, have been explained and discussed. Finally, an interesting topic about the relationship between phase transition and life activity has been introduced.

Keywords: lipid, phospholipid, triacylglycerol, phase transition, polymorphism, crystallization.



上野 聡  
Satoru Ueno  
E-mail: [sueno@hiroshima-u.ac.jp](mailto:sueno@hiroshima-u.ac.jp)



高橋 浩  
Hiroshi Takahashi  
E-mail: [hirotakahashi@gunma-u.ac.jp](mailto:hirotakahashi@gunma-u.ac.jp)

1. はじめに

脂質とは、生体成分であって、疎水性が強く、水に難溶、有機溶媒に可溶の一群の低分子物質を指す。具体的には、脂肪酸、グリセリン脂質、スフィンゴ脂質、アシルグリセロール、蠟（ろう, wax）、ステロイド類などである。<sup>1,2)</sup> これに炭化水素を加え広義の意味で脂質と呼ぶ。Fig.1 に代表的な脂質の化学構造式を記す。<sup>1,2)</sup>

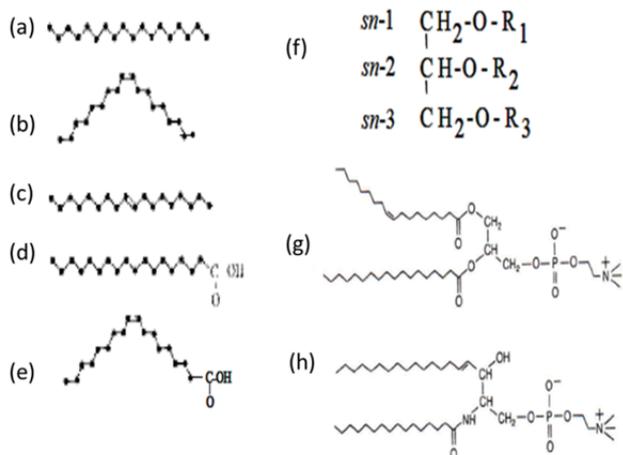


Fig.1 Typical molecules of lipids. (a) *n*-octadecane, (b) *n*-octadecene (*cis*), (c) *n*-octadecene (*trans*), (d) stearic acid, (e) oleic acid, (f) triacylglycerol, (g) phosphatidylcholine, (h) sphingolipid.

脂質は、細胞の形成を担っているコレステロールやリン脂質、物質輸送の担体であるリポソーム（リン脂質の集合体）であり、また、食品においては、アシルグリセロールのうち、モノアシルグリセロール（モノグリセリド、以下 MAG）は乳化剤の役割を、トリアシルグリセロール（トリグリセリド、以下 TAG）は油脂分子として食品油脂に広く利用されている。この他、医薬品や化粧品など応用範囲が広い物質である。<sup>1)</sup>

このように応用範囲が広い理由には、脂質のもつ物性が大きく影響している。脂質の代表的な物性とは、(1) 脂質の多様性、(2) 脂質分子集合体の自己組織化、(3) 複雑な多形現象を有すること、の3点が考えられる。

2. 脂質の物性

まず、(1) 脂質の多様性とは、脂質の種類により状態変化、すなわち相転移の様式が物質ごとに異なり、また、相転移温度が、我々人間の生活温度帯を含む水 (H<sub>2</sub>O) の氷点 (0 °C) から沸点 (100 °C) の間で複雑に変化することである。一般に相転移には、Fig.2 のように互変形的 (enantiotropic) な相転移と単変形的 (monotropic) な相転移があり、このうち、互変形的な相転移 (Fig.2(a)) とは、融点に達する前に固体や液晶などの二つ以上の状態 (多形 (後述)) が互いに可逆的に変化することを指す。この場合、Fig.2(a) のように、A と B が融点までの温度範囲で互いに安定相 (G が低い) として存在する。これに対し、単変形的な相転移 (Fig.2(b)) とは、状態 (多形) 間の転移が融点に達するまで不可逆的に変化することを指す。<sup>1,2,4,5)</sup> この場合、Fig.2(b) に示すように、B が全温度範囲で安定相として存在するが、B になるのに時間がかかるので、準安定相である A が先に出現・存在していることになる。前者には

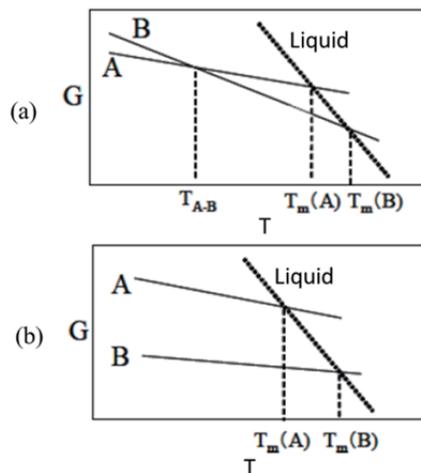


Fig.2 Two ways of phase transformation. (a) enantiotropic, (b) monotropic. G: Gibbs free energy, T: temperature, A and B: phases, T<sub>m(A)</sub> and T<sub>m(B)</sub>: Melting temperature of A and B phase.

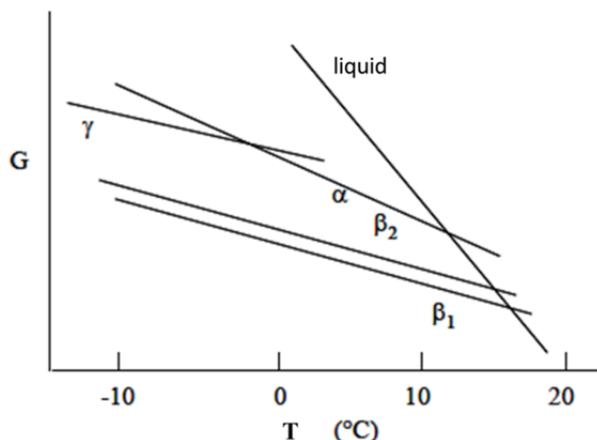


Fig.3 Phase behavior of oleic acid. G: Gibbs free energy, T: temperature, α, β<sub>1</sub>, β<sub>2</sub> and γ: polymorphs of oleic acid.

炭化水素・脂肪酸の多形転移などが、後者には TAG の多形転移がその代表例であるが、同じ物質でも多形転移により互変形的・単変形的な相転移を併せ持つものもあり複雑である。Fig.3 には代表的な脂肪酸であるオレイン酸 (Fig.1(e)) の相挙動を示す。<sup>6)</sup> Fig.3 によれば、オレイン酸の場合、γ, α, β<sub>2</sub>, β<sub>1</sub> と 4 つの結晶多形が存在し、<sup>7,8)</sup> このうち γ 型と α 型の多形転移のみが互変形的で、<sup>9,10)</sup> α 型, β<sub>2</sub> 型および β<sub>1</sub> 型の多形間の転移は単変形的である。<sup>6,10)</sup>

次に、(2) 脂質分子集合体の自己組織化とは、リン脂質や MAG など脂質分子によっては、その両親媒性のゆえに界面活性剤の役割を担い、これらの分子が水中に分散されると、その分子の形状・温度・pH などにより、膜状・立方晶・六方晶・袋状 (エマルションやリポソーム)・球状 (ミセル) など多様な構造を自動的に形成することを指す。<sup>3)</sup>

(3) 複雑な多形現象を有することについて、まず多形とは、同じ組成からなる物質が複数の異なる結晶構造を持つことである。<sup>1,2,4,5)</sup> 結晶多形現象は、基礎物性研究のみならず産業応用の観点でも極めて重要である。たとえば、チョコレートの油脂成分 (TAG) であるカカオ脂 (ココアバター) の場合、I 型から VI 型まで 6 種類の多形を有することが知られており、<sup>11,12)</sup> 多形ごとに融点異なる。このうち、融

点や融解特性および結晶化に伴う収縮率がチョコレートに最も適しているのはV型多形であり、したがって世界中のチョコレートメーカーやショコラティエ（チョコレート作製の専門職人）は、どろどろに融けたチョコレートからいかにしてV型多形のみで結晶化させるかが大問題であり、これにはテンパリング（温調）法や種結晶添加法があり広く応用されている。<sup>11-13)</sup>

互変形的と単変形的な相転移の箇所として記したように、冷却温度や冷却速度により多形の現われ方は非常に異なり、熱測定を行った際の発熱・吸熱ピークも複雑である。

本稿では、代表的な脂質としてトリアシルグリセロールとリン脂質を取り上げ、それぞれの脂質の基礎物性（熱物性と構造物性）、熱測定データの解釈、また熱測定データを用いてどのように多形を同定するのか？について紹介したい。

### 3. トリアシルグリセロールの熱測定

トリアシルグリセロール（以下、TAG）とは、油脂分子のことを指す。<sup>1, 2)</sup> 化学構造式は Fig.1(f) に示してある。アルキル基 ( $R_1, R_2, R_3$ ) に脂肪酸鎖を結合させる。したがって、脂肪酸鎖の種類や $R_1, R_2, R_3$ への結合順を変えることにより多様なTAGがある。前節で記したように、TAGの多形転移は、単変形的である (Fig.2(b))。TAGの多形転移には、準安定多形の固相からより安定な固相への固相転移、高温の融液から冷却し結晶化する単純冷却転移、そして融液中の油脂が結晶化する融液媒介転移 (melt-mediated transformation) が知られている。<sup>1, 2, 4, 5)</sup> このうち、融液媒介転移では、単変形的な相転移のために、加熱により安定性の低い多形が融けた後、より安定な多形が結晶化する連続的な相転移に対応する現象であり、融解による吸熱変化の直後に発熱変化が見られる。例として、3つのアルキル基がいずれも炭素数16の飽和脂肪酸であるパルミチン酸により構成されているTAGであるトリパルミトイルグリセロール (PPP) の加熱曲線を Fig.4 に示す。47.1 °Cで吸熱、引き続き50.8 °Cで発熱が生じ、その後67.8 °Cで再び吸熱が生じている。これは、まず、47.1 °Cにおいて吸熱ピークは不安定な $\alpha$ 型多形（以下、 $\alpha$ 型）が融解し、引き続き最安定な $\beta$ 型多形（以下、 $\beta$ 型）が融液媒介転移により50.8 °Cで結晶化し、最後に $\beta$ 型が67.8 °Cで融解している。ここで、代表的なTAGであるPPPの典型的な三種類の多形  $\alpha, \beta', \beta$ 型多形のX線回折パターンと対応する構造モデルと結晶型を Fig.5 に示す。<sup>1)</sup> これは、脂肪酸鎖の配列様式と対応しており、脂肪酸鎖が六方晶 (Hexagonal(H)), 斜方晶 (Orthorhombic( $O_{\perp}$ )), 三斜晶 (Triclinic( $T_{//}$ )) に配列したものは、それぞれと $\alpha, \beta', \beta$ 型と名付けられ<sup>14)</sup>、副格子構造 (subcell structure) と呼ばれる ( $O$ には $\perp$ ,  $T$ には $//$ の添字が付いているが詳細は長くなるので省く)。この副格子構造は、TAGに共通である。安定性は、 $\alpha$ 型が最も不安定で、 $\beta$ 型が最も安定である。 $\beta'$ 型多形（以下、 $\beta'$ 型）は $\alpha$ 型と $\beta$ 型の中間多形である。

温度変化の仕方にもよるが、一般に多形の数が多ければ多いほど、これら単純冷却転移や固相転移、そして融液媒介転移を含むより複雑な多形転移を示す。以下、複雑な多形転移を示すTAGの加熱・冷却速度をさまざまに変化させた際のDSC測定および放射光X線回折 (SR-XRD) 測定結果を例にとり解説する。ここで、SR-XRDの測定結果も同時に示すのは、DSCではそれぞれの発熱、吸熱ピークにより多形を同定することはできないが、同じ速度で測定したSR-XRD実験と比較することにより、どの発熱・吸熱ピークがどの多形の消滅と出現に対応しているか同定が可能となるからである<sup>15)</sup>。

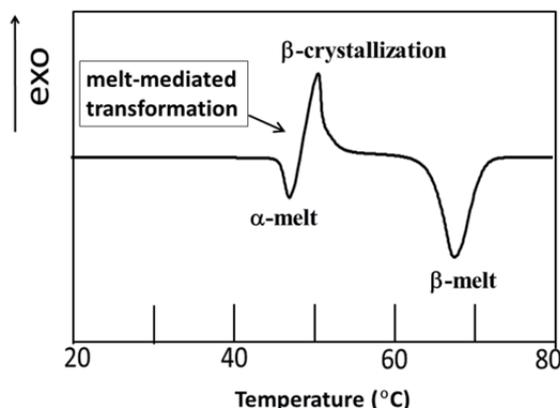
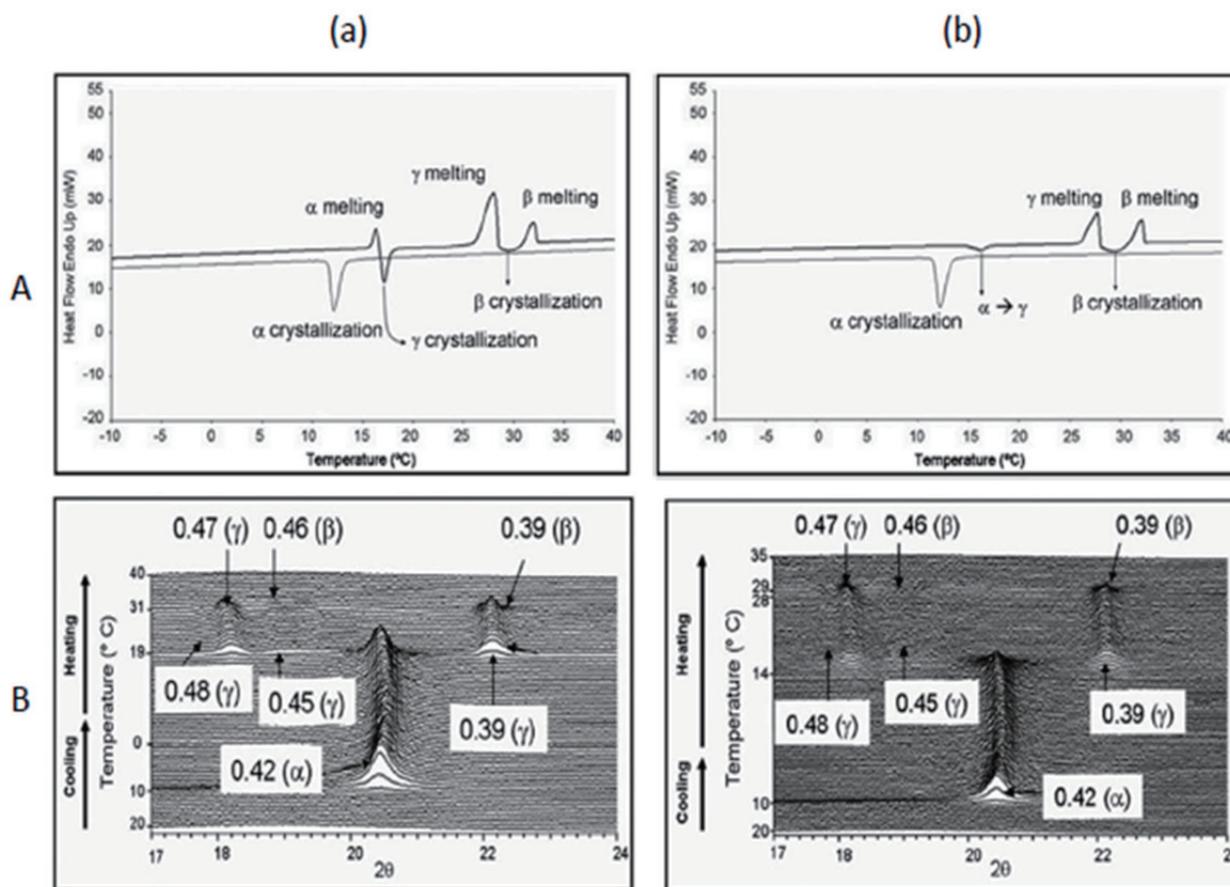


Fig.4 DSC heating thermogram of tripalmitoyl glycerol (PPP). Heating rate is 5°C/min.

Polymorphic form	$\alpha$ form	$\beta'$ form	$\beta$ form
X-ray Diffraction pattern (nm)	0.415	0.413, 0.380	0.459, 0.386, 0.368
subcell structure model (nm)			
crystal form	H	$O_{\perp}$	$T_{//}$

Fig.5 X-ray diffraction patterns and corresponding subcell structure models of polymorphic forms of PPP. H : hexagonal,  $O_{\perp}$  : orthorhombic perpendicular,  $T_{//}$  : triclinic parallel.

Fig.6は、代表的なTAGであるPOP (1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl glycerol) の多形転移の現われ方を調べたDSC曲線およびSR-XRD測定の結果を示している。<sup>16)</sup> POPは、チョコレートの主原料であるカカオ脂の主成分の一つであり、かつ食品から洗剤にいたるまで応用範囲の広いパーム油の主成分でもある。このため最もよく研究されている油脂であるが、高純度試料の入手が困難なため、基礎研究は数少ない。佐藤らが先駆的な研究を行い、<sup>1, 17-19)</sup> それによれば、結晶多形は、安定性の低い方から順に $\alpha, \gamma, \delta, \beta'_2, \beta'_1, \beta_2, \beta_1$ の7種類が確認されており、各多形の融点および副格子間隔等は明らかであるが (Table 1), 結晶構造は最安定多形のみリートベルト法を駆使した粉末回折法により構造が提案されている。<sup>20)</sup> しかし誤差が大きく、異論もある。単結晶を用いた精密構造解析が望まれるが、未だ解明されていない。Fig.6について、まず2°C min<sup>-1</sup>で冷却した後に2°C min<sup>-1</sup>で加熱した場合 (Fig.6(a)), DSC曲線では、冷却過程の13.6°Cで $\alpha$ 型の結晶化の発熱ピークが現われる。それに対応するSR-XRDの広角回折ピークに $\alpha$ 型を示す0.42 nmの回折ピークが同じ温度で現われる。 $\alpha$ 型の結晶化の後に速やかに2°C min<sup>-1</sup>で加熱すると、15.7°Cで $\alpha$ 型が融解し、その直後の16.7°Cで $\gamma$ 型が結晶化する ( $\gamma$ 型の副格子構造は未解明で



**Fig.6** Polymorphic behavior of POP, (a) cooling at  $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  and heating at  $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  and (b) cooling at  $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  and heating at  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . For both, A; DSC patterns and B; wide-angle SR-XRD patterns.

**Table 1** Thermal and structural data for polymorphs of POP.

polymorphs	Melting Point (T/K)	Enthalpy of fusion: $\Delta H_f$ /kJmol <sup>-1</sup>	Subcell short spacing (Å)
$\alpha$	288.2	68.1*	4.21 (vs)
$\gamma$	300.0	92.5	4.74 (s), 4.46 (m), 3.90 (s), 3.58 (w)
$\delta$	302.2	107.5	4.29 (s), 4.13 (s), 3.83 (s)
$\beta'_2$	303.3	95.5	4.38 (w), 4.23 (s), 4.15 (m), 3.96 (s), 3.83 (w)
$\beta'_1$	306.5	98.3	4.45 (w), 4.27 (m), 4.13 (m), 3.96 (s), 4.61 (vs), 4.07 (m)
$\beta_2$	308.1	124.4	3.93 (m), 3.82 (m), 3.72 (m), 3.62 (w), 3.55 (w), 3.52 (w)
$\beta_1$	309.7	130.2	4.61 (vs), 4.07 (m), 3.88 (m), 3.82 (m), 3.72 (s), 3.67 (m)

\* : Enthalpy of melt crystallization was measured on  $\alpha$ . vs : very strong, s : strong, m : medium, w : weak.

ある)。その $\gamma$ 型はさらなる加熱によって $26.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ で融解するが、 $28.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ で $\beta$ 型の結晶化の発熱ピークが現われ、さらに $30.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ で $\beta$ 型が融解する。ここで生じた $\alpha$ 型の融解とその直後の $\gamma$ 型の結晶化では、融液媒介転移が生じていることがDSC曲線からも明らかである。**Fig.6(a)**のDSC曲線では、融液媒介転移が $\gamma$ 型から $\beta$ 型への相転移でも生じていることが示されている。一方、同じ $\alpha$ 型から出発して $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ で加熱すると(**Fig.6(b)**)、多形転移の様相が一変する。すなわち、 $14.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ で $\alpha$ 型から $\gamma$ 型の固相転移に伴う発熱ピークが現われる。転移した後に $\gamma$ 型は $26.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ で融解し、 $28.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ で融液媒介転移が生じ $\beta$ 型が結晶化する。その後 $31.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ で $\beta$ 型が融解する。

**Fig.6**において加熱速度が $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (**Fig.6(a)**)と $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (**Fig.6(b)**)の二つの場合の多形の現れ方の最大の相違は、**Fig.6(a)**の場合は $\alpha$ 型から $\gamma$ 型への融液媒介転移、**Fig.6(b)**の場合は $\alpha$ 型から $\gamma$ 型の固相転移である点である。SR-XRDでは、はっきりと判りかねるが、DSC曲線にはこの違いが明確に表れている。

この加熱速度による多形転移の様式の相違は次のように考察される。加熱速度が比較的大きい場合 ( $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (**Fig.6(a)**))の場合、より不安定な $\alpha$ 型から $\alpha$ 型の融点以上に、比較的短時間で温度が上がり、 $\alpha$ 型結晶中に、より安定な $\gamma$ 型の結晶核が十分に発生する機会が得られないままに、温度が $\alpha$ 型の融点以上に達して $\alpha$ 型は融解してしまい、融液状態からの $\gamma$ 型の結晶化が引き起こされたのに対し、加熱速度が比較的小さい場合 ( $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (**Fig.6(b)**))の場合、より不安定な $\alpha$ 型から $\alpha$ 型の融点以上に温度が達するのに比較的長時間かかり、 $\alpha$ 型結晶中に、より安定な $\gamma$ 型の結

晶核が多数発生するのに十分な時間が確保され、 $\alpha$ 型の融点に達し、 $\alpha$ 型結晶が崩壊し融液状態になる前に、崩壊したTAG分子が $\gamma$ 型の結晶核の周囲に集まり $\gamma$ 型結晶が生じた(固相転移)と考えられる。 $\gamma$ 型の融点以下で長時間にわたり等温保持すれば、 $\gamma$ 型から $\delta$ 、 $\beta'_2$ 、 $\beta'_1$ 型を経て $\beta$ 型への固相転移が観察されると考えられるが、これには長時間を要するため、このような長時間の観察は報告されていない。しかし、温度上昇をさせた場合、 $\gamma$ 型から $\beta$ 型への多形転移がFig.6に示すように報告されている<sup>16)</sup>。この場合、Fig.6(a)とFig.6(b)とは差異は見られず、どちらも融液媒介転移を示しているが、これは上記の $\alpha$ 型から $\gamma$ 型への多形転移に関する考察と同じで、 $\beta$ 型の結晶核形成に要する時間が非常に大きいためと考えられる。便宜上、本稿ではこれ以上紹介できないが、冷却後の加熱速度が $0.1\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ という非常にスローな加熱速度でも $\beta$ 型の多形転移は融液媒介転移しか現れず、 $\beta$ 型の結晶核形成に要する時間は非常に大きいことが明らかとなっている。<sup>16)</sup>

## 4. リン脂質の熱測定

### 4.1 リン脂質の種類と生体における主要リン脂質

リン脂質とは、1つ以上のリン酸基を含む脂質である。リン脂質は親水性部分と疎水性部分を併せ持つ両親媒性分子で、水中では自己集合しミセルや二重層膜構造を形成する。特に、二重層膜構造は、一般に生体膜と呼ばれる細胞膜ならびに細胞内小器官の膜組織の基本骨格であるために、生物学的観点から広く研究されている。

リン脂質の親水性部分は、頭部と呼ばれ、その疎水性部分は、比較的長鎖の炭化水素鎖から成るので、足、尾部、疎水鎖などと呼ぶ。頭部は、極性を持っているため極性頭部と称することが多い。Fig.1(g)に示されているように、生体膜内に見出されるリン脂質の大半が、1分子あたり2本の炭化水素鎖を持つ。その内の一本の炭化水素鎖がアミド結合で骨格部分に結合しているリン脂質は、スフィンゴリン脂質(Fig.1(h))と呼ばれる。生体でより多く見出されるグリセロリン脂質(Fig.1(g))では、アシルグリセロールと同じく脂肪酸がエステル結合し、アシル鎖を形成している。2本鎖の場合では、脂肪酸がグリセロール骨格1、2位の位置に結合する。そして、3位にリン酸基が結合したものが、グリセロリン脂質である。疎水鎖を一本しか持たないリン脂質は、リゾ体とよばれ、生体内では主に、リン脂質加水分解酵素の働きにより、炭化水素(脂肪酸)鎖が切り離されることで生成する。切り離されたある種の脂肪酸は、細胞内でシグナル伝達物質やその他の生理活性物質として働く。例えば、アラキドン酸は酸化されるとエイコサノイドと称されるホルモン様分子になる。エイコサノイドは、平滑筋収縮、炎症、血流調節などの様々な生理機能に関与する。<sup>21)</sup>

リン酸基の先にどのような官能基が結合するかによってグリセロリン脂質は、さらに細かく分類される。哺乳動物細胞に最も多く見出されるリン脂質は、コリン基が結合したホスファチジルコリン(PC)で、2番目に多いものはエタノールアミン基が結合したホスファチジルエタノールアミン(PE)である。<sup>22)</sup>コリン基、エタノールアミン基とも中性pH水溶液中で解離して1価の正電荷を持っている。一方、中性pHでは、リン酸基は1価の負電荷を持っているので、全体として極性頭部は正味の電荷を持たない。よって、PCやPEは中性リン脂質として分類される。アミノ酸のセリン基がリン酸基に結合しているホスファチジルセリン(PS)の極性頭部は、中性pHで負電荷を持つため、酸性リン脂質として分類される。哺乳動物においては、PS

が代表的な酸性リン脂質である。バクテリアなど菌類では、代表的な酸性リン脂質は、ホスファチジルグリセロール(PG)で、その名のとおりリン酸の先には解離する部分を持たないグリセロール基が結合している。極性頭部が正味に正の電荷を持つリン脂質は、生体内では見いだされていない。

以上は、極性頭部の種類による分類であったが、疎水部の脂肪酸の種類によってもリン脂質は分けられる。脂肪酸には、二重結合を含む不飽和脂肪酸と二重結合を含まない飽和脂肪酸に分類される。生体内で見いだされる脂肪酸の炭素数は、およそ、14から22の範囲である。ただし、スフィンゴリン脂質では、炭素数が24や26の非常に長鎖の脂肪酸が見いだされる場合がある。哺乳動物では、飽和脂肪酸としては炭素数が16のパルミチン酸が比較的多く、不飽和脂肪酸としては、二重結合が1つで炭素数が18のオレイン酸(Fig.1(e))が代表的なものである。1つの脂肪酸鎖内に見いだされる二重結合の数も相違があるが、その数は最大でも6程度である。生体内で見いだされるリン脂質では、グリセロールの1位の位置の脂肪酸が飽和で、2位の位置の脂肪酸が不飽和という組み合わせが多い。

### 4.2 生体膜とリン脂質膜

生体膜中の膜タンパク質は、流動性を持った脂質二重層膜に、疎水性相互作用で結合し、その脂質膜内を自由に拡散できると考えられている。この存在様式のモデルは、膜の流動性を基礎とし、異なる種類の膜タンパク質分子が膜内で、バラバラとモザイク状に分布していることから「流動モザイクモデル」<sup>23)</sup>と呼ばれている。

多くの実験事実からこのモデルは支持されているが、一時的ないしは局所的には、「ラフト(筏)・ドメイン」とよばれる特定脂質から成る流動性の乏しい領域が生体膜中に存在し、そこには特定な膜タンパク質が集合して、機能的な領域を形成しているとする考え方<sup>24)</sup>も提案されてきている。人工膜系において、特定脂質から成るドメインの存在が実験的に確認されていることが、そのモデルの根拠の1つとなっている。<sup>25)</sup>また、ある機能を発現するために、その機能に関与する複数の膜タンパク質を、予め箇所に集めておくことは機能発現にとって効率的であると考えられる。しかし、「ラフト・ドメイン」の生体膜での存在、また、存在するとしても、そのサイズ、存在時間等に関しては議論が続いており、現時点では研究者の間でコンセンサスは得られていない。<sup>26)</sup>

生体膜における脂質二重層の機能として要請されるものは、(1)細胞の内と外を分けるバリア機能と、(2)膜タンパク質がその機能を発揮させるために必要な環境を提供することの2つがある。後者に関しては、通常は、流動的な環境を、また、ある特殊な場合には、ラフト・ドメインのような非流動的な環境を提供する必要もある。この2つの機能のみでよいならば、それを実現するために必要なリン脂質種は、数種類から十数種類で十分であるように思える。しかし、先に述べたように、リン脂質は、極性頭部の違い、疎水部の脂肪酸の種類の違いの組み合わせを考えると実に様々なものが存在する。哺乳動物の細胞膜には、数千種のリン脂質<sup>27)</sup>、リン脂質以外の脂肪酸、コレステロール・エステル等の脂質も含めれば、18万種類の脂質が含まれているとする見積もり<sup>28)</sup>も成されている。この種類の膨大さは、脂質生物学にとっては最大の謎の一つである。

### 4.3 リン脂質の結晶

リン脂質も他の脂質同様に結晶化する。しかしながら、良質な結晶を得ることは難しく、精密な構造解析が成功し

ているリン脂質は数種類しかない。

2 本鎖のリン脂質として最初に精密結晶構造解析が成功したのは、炭素数 12 の飽和脂肪酸ラウリル酸を疎水鎖にもつジラウロイルホスファチジルエタノールアミン (DLPE) である。<sup>29)</sup> この DLPE の結晶は酢酸溶媒から結晶化して得られた。DLPE は結晶格子内で、二重層を形成しており、脂肪酸長軸方向は二重層の膜面にほぼ垂直である。一方、極性頭部の部分の双極子の向きは、膜面がほぼ平行になっている。隣り合う極性頭部のリン酸基の酸素とエタノールアミン基のアミノ部分の窒素との間で水素結合のネットワークが形成されている。

動物細胞で最も多い PC に関しては、炭素数 14 のミリスチン酸を脂肪酸鎖にもつジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC) の精密結晶構造解析の結果<sup>30)</sup> が報告されている。この DMPC 結晶は、エーテル/エタノール/水混合溶媒から結晶化して得られたもので、単位格子内に 4 個の DMPC 分子と 4 個の水分子を含んでいる。DLPE も単位格子内に 4 個のリン脂質分子を含み、全て同一のコンフォメーションを取っているのに対して、DMPC では異なる 2 種類のコンフォメーションを取っている。また、極性頭部間における水素結合の様式も両者では異なっている。DMPC では、DLPE で見られている極性頭部間の直接的な水素結合はなく、水分子を介しての水素結合ネットワークが形成されている。すなわち、極性頭部のリン酸基の酸素が水分子と水素結合し、その水分子が隣の DMPC 頭部のリン酸基の酸素と水素結合するということを介して繋がっている。

この結晶状態における DMPC と DLPE の極性頭部間にみられる相互作用の違いが、水和した PC 膜と PE 膜の物性の差にも反映していると考えられる。例えば、水和した PC 膜と PE 膜では、分子充填の度合いは、PE の方が密であること<sup>3)</sup>や、PC は水和しやすいが、PE は水和し難いといった水和特性の差<sup>31)</sup>の背景には、極性頭部間の水素結合の様式の差がある。

#### 4.4 水和したリン脂質膜の相転移

結晶構造解析からは、水素結合などのリン脂質分子間の詳細な情報が得られる。しかし、生物学的に興味があるのは、水和した状態で形成する膜構造の方である。アシルグリセロールなどと同様に、温度変化により、この水和したリン脂質の膜構造も相転移を起こし、構造および状態変化を起こす。そこで、次に、哺乳動物における主要リン脂質の PC と PE の水和状態での相転移について考える。この相転移は、水含量によっても変化するが、紙面の関係から、実際の細胞が置かれている状況に近い過剰水が存在する条件のみを取り扱う。具体的には、脂質 1 分子に対して、水分子が数十個以上存在する条件のみを考える。また、2 本の疎水鎖のそれぞれの脂肪酸組成が異なる非対称リン脂質に関しては、相転移挙動が複雑になるため、ここでは取り上げない。水和したリン脂質膜を、氷点下近くの温度に数日から数ヶ月保存することで形成される真の意味での熱力学最安定相である水和結晶 (サブゲル) 相の出現問題は興味深い、生物学的興味を優先させて、ここでは議論しないこととする。

2 本鎖のリン脂質を水に分散させると疎水性相互作用により疎水鎖同士、極性頭部同士が集合するために、二重層膜構造を作る。ただし、平面構造では、端の部分で疎水鎖が水に触れてしまうために、全体として綴じた袋状になる。これを、リポソームないしベシクルと呼ぶ。これは簡単な細胞モデルとして扱える。また、二重層膜の部分はラメラと称される。実際の細胞では、二重層膜は一層である。そ

の様な一層のベシクルは、ユニ・ラメラ・ベシクル (ULV) と呼ぶ。純粋な中性リン脂質を水に分散させた場合、ラメラ間に長距離で働く静電相互作用のような強い反発相互作用が働かない<sup>32)</sup> ために、一定のラメラ間隔をもって、タマネギのように二重層膜が何層にも積み重なったマルチ・ラメラ・ベシクル (MLV) と呼ばれるものを形成するのが普通である。

Fig.7(a)に示したように、ジエライドイル-PE(DEPE)の DSC サーモグラムにおいて、約 38°C と約 63°C に転移ピークが観察される。前者の約 38°C の吸熱ピークは、ゲル ( $L_{\beta}$ ) 相と呼ばれる相から、液晶 ( $L_{\alpha}$ ) と呼ばれる相への転移に由来する。 $L_{\beta}$  相では、炭化水素鎖がほぼオールトランスのコンフォメーションを取り、真っ直ぐに伸び、2 次元の六方格子に充填している結晶に近い状態にある。 $L_{\alpha}$  相では炭化水素鎖が融解してゴーシュのコンフォメーションも取り得る状況になる。その結果、リン脂質分子がかなり自由に動ける。この  $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$  転移の転移エンタルピーは、約 36 kJ mol<sup>-1</sup> である。

DEPE のゲル ( $L_{\beta}$ ) 相では、脂肪酸鎖は膜面に対して垂直に配向している (Fig.7 中の模式図参照)。この  $L_{\beta}$  相と結晶状態の違いは、次の 2 点である。 $L_{\beta}$  相における極性頭部は、結晶とおなじく膜面にほぼ平行に横たわっているが (Fig.7 中の模式図では、それは表現されていない)、その向きは無秩序になっていて周期格子構造を形成していない。また、リン脂質分子のラメラの側方における移動も、 $L_{\alpha}$  相ほどではないが、結晶状態と比較すれば許された状況となっている。

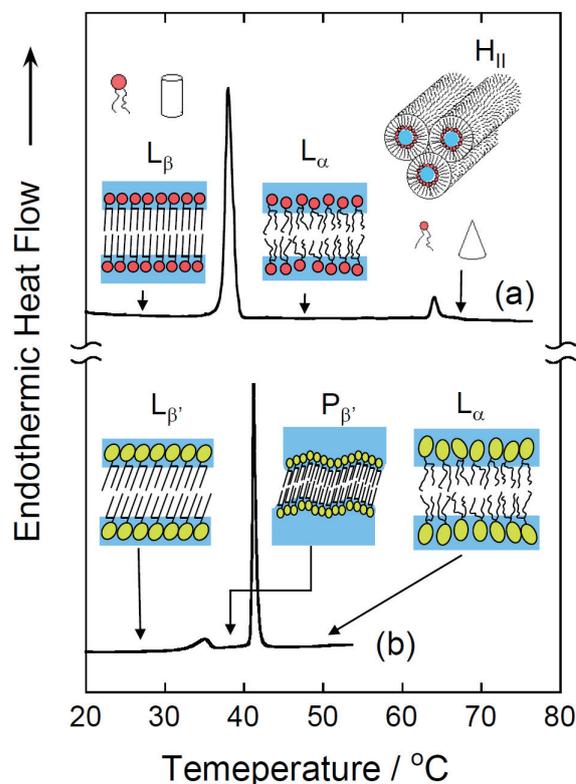


Fig.7 DSC curves of fully hydrated (a) dielaidoyl-PE (DEPE) and (b) dipalmitoyl-PC (DPPC) multilamellar vesicles. These DSC data were obtained from heating scans. The inserts show schematic illustrations of phospholipid molecular assemblies in the different phases separated by the phase transitions, and mean packing shape of a phospholipid molecule (cylinder, left, and inverted cone, right). See text for the details.

約 63°Cに見られる小さい転移ピークは、 $L_{\alpha}$ 相から逆ヘキサゴナル ( $H_{II}$ ) 相と呼ばれる相への転移に対応する。模式図に示したように  $H_{II}$  相では、円柱状の水をリン脂質分子が取り囲むように配置し、全体として、その円柱が 2次元の六方格子に配置された形をとっている。この相転移の起こる機構は、以下に述べるように、分子形状の変化<sup>33)</sup>によって説明されてきている。PE の極性頭部は、PC と比較すると小さいが、それでも  $L_{\beta}$ 相および  $L_{\alpha}$ 相においては、脂肪酸 2本が占める面積と、PE の極性頭部が膜面内で占める面積はほぼ等しい。そのため、Fig.7 の左上に模式図で示したように、分子 1 個の全体的形状は円柱状と見なせる。円柱を詰め込めば、平面構造が出来上がる。そのため、ラメラ構造を取る。温度が上昇すると脂肪酸鎖部分の運動性が増し、鎖部分が占める側方面積は増大する。一方、水素結合による頭部同士の強い相互作用により、PE の極性頭部の占有面積はあまり増大しない。その結果、Fig.7 の右上の模式図で示したように分子 1 個の全体的形状は、道路標識に使われるトラフィックコーン状になる。これでは、通常の二重層膜構造にリン脂質分子を充填させることが不可能になり、その結果、 $H_{II}$  相に転移する。 $H_{II}$  相は、非二重層膜構造の代表例である。

生体膜の脂質部分が  $H_{II}$  相に転移すると、バリア機能は破壊される。ただ、膜融合などのプロセスにおいては、一時的・局所的には  $H_{II}$  相様構造が出現する可能性は十分に考えられる。実際、 $H_{II}$  相を形成しやすい脂質を含むベシクルの方が膜融合を起こしやすいことを示す実験結果<sup>34)</sup>が報告されている。

Fig.7(b)に示したように、ジパルミトイル-PC(DPPC)の MLV の DSC サーモグラムにも 2つの吸熱ピークが観察される。低温の方の約 35°Cのピークは、前転移と呼ばれる相転移に対応する。そのピークの低温側では、ゲル相であるが、PE のゲル相と異なり、脂肪酸鎖は膜面に対して傾いている。また、脂肪酸鎖が作る 2次元格子は六方格子でなく、斜方晶系(orthorhombic)である。この鎖の傾きを区別するため、記号としては  $L_{\beta}$ を使う。このプライム (prime) 「'」は、炭化水素鎖が傾いていることを表している。PC の前転移では、この  $L_{\beta}$ 相からリップル ( $P_{\beta}$ ) 相と呼ばれる相へ転移する。リップル (ripple) とは「さざ波」を意味する。その名のとおり、膜面が波打った構造を取る (Fig.7 の模式図参照)。どのような機構により、このような波打ち構造になるかは、まだ良く分かってはいないが、前転移で観測される約 4.5  $\text{kJmol}^{-1}$  の転移エンタルピーは、脂肪酸鎖の一部の融解によるとする解釈<sup>35,36)</sup>が主流になりつつある。融解した部分とそうでない部分が周期的に存在する<sup>37)</sup> ために、周期的に波打った構造なると考えられている。前転移の小さいピークに対して、約 42 °Cに観測される大きい (転移エンタルピー約 32  $\text{kJ mol}^{-1}$ ) ピークは、DPPC の主転移と呼ばれる転移に由来する。主転移では、 $P_{\beta}$ 相から  $L_{\alpha}$ 相へ転移する。飽和脂肪酸鎖を持つ PC では過剰水が存在する条件下では、どんなに高温 (ただし水の沸点の 100 °C 以下) にしても  $H_{II}$  相へは転移しない。PC の極性頭部の水和しやすさのために、水和水を含めた実効的な極性頭部の大きさは、PE と比較すると大きく、高温によって脂肪酸鎖の運動が増大し膜面の側方に広がっても、決して PE のように分子形状がトラフィックコーン状にならないためである。

#### 4.5 飽和リン脂質膜の相転移の炭素数依存性

前節では、極性頭部の違いが、その相転移挙動にどのような差をもたらすかについて述べた。リン脂質は、その脂肪酸鎖にも多様性があるため、次に脂肪酸の違いが相転移挙動にどう影響するかについて考える。紙面の関係もあり、

2本の脂肪酸が同一の飽和 PC と飽和 PE のみを取り扱う。すなわち、単純に相転移挙動の炭素数依存性を検討する。それに基づき、リン脂質膜の  $L_{\alpha}$ 相がどれだけ液体的であるかを考察する。また、リン脂質の相転移と昆虫の耐寒・耐熱性の関連性についても触れる。

Fig.8 は、飽和 PC, PE の相転移挙動を DSC で調べた結果がまとめたハンドブック<sup>38)</sup>や総説<sup>39,40)</sup>を使い、飽和 PC, PE の  $P_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$ 転移および飽和 PE の  $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$ 転移の転移温度と転移エンタルピーの報告値の平均値を計算し、それを脂肪酸鎖の炭素数に対してプロットしたグラフである。さらに、それらの値から計算した転移エンタルピーも Fig.8(b)に示した。また、Fig.8(a)には、飽和 PE の  $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$  転移の転移温度も一緒にプロットした。ただし、 $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$  転移の報告は少ないために、平均値は計算せず、報告値をそのままプロットした。よって同じ炭素数に対して複数の

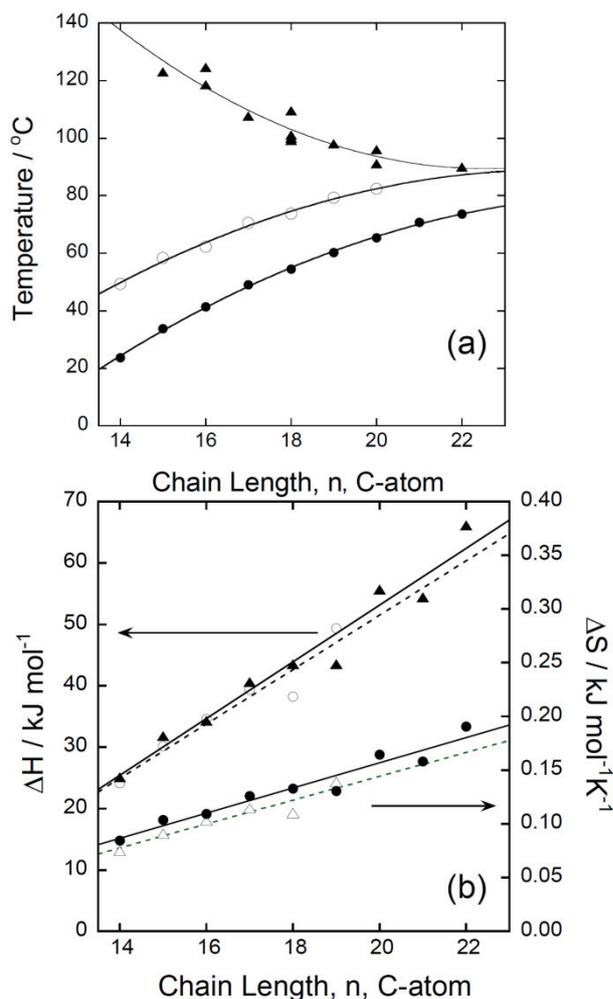


Fig.8 (a) Dependence of the transition temperature on the chain length of saturated symmetric PC ( $P_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$  phase transition, closed circles ●) and saturated symmetric PE ( $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$  phase transition, open circles ○, and  $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$  phase transition, closed triangles ▲). The curves are best-fitting parabolic lines. (b) Dependence of the transition enthalpy values on the chain length of saturated symmetric PC ( $P_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$  phase transition, closed triangles ▲) and saturated symmetric PE ( $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$  phase transition, open circles ○) and dependence of the transition entropy values on the chain length of saturated symmetric PC ( $P_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$  phase transition, closed circles ●) and saturated symmetric PE ( $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$  phase transition, open triangles △). The lines are best-fitting linear regression lines.

データ点があるものも含まれる。水の沸点は 100 °C なので、Fig.8(a)にプロットした 100 °C 以上の  $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$  転移温度は、加圧条件下で得られたデータであり厳密な定量的な比較には多少問題がある点に注意されたい。

転移温度の炭素数依存性を見ると、 $n$ -アルカンの融解転移や飽和脂肪酸の安定結晶相の融解転移で顕著に見られる奇偶性は、リン脂質、少なくとも PC, PE ではあまり明確でなく、全体としては炭素数の増加とともに滑らかに変化している。この理由の 1 つは、 $L_{\beta}$  相が結晶よりも秩序度が低く、自由度があるために、炭化水素鎖の末端の充填に炭素数の奇偶の差は、問題にならないためと思われる。

転移温度の依存性は、2 次関数的であるが、転移エンタルピーの方は、ほぼ直線的になっている。転移エンタルピーの値が大きいため、その値と転移温度から計算される転移エントロピーの炭素数依存性も直線的であった。その直線の傾きを最小二乗法により求めたところ、PC では、 $11.7 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \text{ n}^{-1}$ 、PE では、 $11.1 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \text{ n}^{-1}$  の値であった。ここで  $n$  は、Fig.12 の横軸の値であるところの脂肪酸の炭素数である。ただし、ここで扱ったリン脂質は、2 本鎖なので、1 個のメチレン基 ( $\text{CH}_2$ ) あたりの値にすると、PC では、 $5.9 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ 、PE では、 $5.6 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  になる。

ところで、飽和 PC に関しては、Heimburg が彼の著書“*Thermal Biophysics of Membranes*”<sup>41)</sup>において、自分たちのデータを使い、同様に、メチレン基 1 個あたりの転移エントロピーの値を  $9.05 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  と算出している。ただし、Heimburg は、前転移の転移エンタルピーは、脂肪酸鎖の融解に由来するとの解釈のもと、前転移と主転移の転移エンタルピーを合計し、その合計の値を主転移温度で割ることで、上記の値を算出している。また、彼は、その結果は、簡単な統計力学的考察から得られる値と極めて良く一致していると書いている。その考察では、転移に伴う脂肪酸鎖のコンフォメーション変化によって生じるコンフォメーション・エントロピー変化が、ここで求めた転移エントロピーに相当するとした。

彼は、この値を、次のように近似計算した。低温相では完全オールトランスであるとされた。たった 1 つのコンフォメーションなので、そのコンフォメーション・エントロピーはゼロと考えた。高温相では、トランスに加えて、その状態から 120 度左右に回転した 2 種類のゴーシュ・コンフォメーションが存在する。この 3 種類のみをコンフォメーションを取ると仮定し、高温相では、その 3 種の出現確率は全く同じであるとする。この仮定から、気体定数を  $R$  とすると、 $R \ln 3$  でコンフォメーション・エントロピー変化が計算できる。これに数値を入れると、 $9.134 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  となる。この値は、先の値  $9.05 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  とよく一致している。しかし、この値は、ここで求めた我々の値とは一致していない。

PC の場合は、前転移の転移エンタルピーをどう扱うかが問題になるが、PE の場合は、Heimburg の議論と直接的に対応させることができる。我々の値が、Heimburg の統計力学的計算値よりも小さい理由として、飽和 PE の  $L_{\alpha}$  相の脂肪酸のコンフォメーションが、全くランダムでないためであると考えられる。つまり、完全に液体的になっている訳ではなく、多少の秩序度が残っているとすれば解釈がつく。膜という 2 次元制限もあるうし、PE では極性頭部間の相互作用も大きいため、側方方向への膨張も制限されている点なども、その要因であろう。最近の分子動学的シミュレーションの計算結果でも、DPPE の  $L_{\alpha}$  相のゴーシュ割合は、約 0.2-0.3 であると報告されている。<sup>42)</sup> 全くランダムであれば、その値は 0.67 となると期待されるが、その値よりも低くなっている。

最後に、生物学的話題を 1 つ述べる。哺乳動物と異なり、ショウジョウバエの生体膜における第一主要リン脂質は PE である。そのような昆虫において、その耐寒性・耐熱性と PE の脂肪酸組成の関係が調べられ、興味深い結果が報告されている<sup>43)</sup> ので、それを紹介する。ショウジョウバエの世代交代間中に人為選択を行い耐寒性の高い系統をより分け、その脂肪酸組成を調べた結果、耐寒性の高い系統では、耐寒性の低い系統と比較すると PE の  $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$  転移温度を低下させるような脂肪酸鎖の割合が増大していることが見出された。生体膜のリン脂質二重層膜は基本  $L_{\alpha}$  相の状態であることが望ましいので、期待通りの結果である。 $L_{\beta}$  相に転移すると膜の流動が失われ、膜タンパク質の膜内での移動が、制限され生体膜の機能が低下する。また、永続的に  $H_{II}$  相状態になることも、膜構造が破壊され、バリア機能を失い致命的になる。先の人為選択によって得られた耐寒性の高い系統は、同時に高温のストレスにも強い耐熱性も併せ持っていたのである。これは Fig.8(a)から判断すると、 $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$  転移温度の低下とともに、 $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$  転移温度の上昇が起こったために、その論文の著者たちも考察しているように、ショウジョウバエは、耐寒性と同時に耐熱性をも獲得したと解釈される。Fig.8(a)では飽和 PE のデータしかプロットしていないが、不飽和 PE でも、 $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$  転移温度が低いものほど、 $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$  転移温度が高い傾向をもつ。<sup>44)</sup>

## 謝 辞

本解説で紹介した放射光データは、高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光研究施設 BL-9C および BL-6A ステーションにおいて、実験課題番号 2010G114 および 2010G656 の実験の一環として得られたものである。

## 文 献

- 1) 佐藤清隆, 上野 聡, 「脂質の機能性と構造・物性-分子からマスカラ・チョコレートまで-」 (1章), 丸善出版, 東京 (2011).
- 2) D. M. Small, “*The Physical Chemistry of Lipids – from Alkanes to Phospholipids-*” (Chap. 10) Plenum Press, New York (1986).
- 3) R. B. ゲニス, 「生体膜」 (2章), 西島, 他訳, シュプリンガー・フェラーク東京 (1990)
- 4) K. Sato, “*Crystallization and Polymorphism of Fats and Fatty Acids*” (Chap. 1) edited by N. Garti and K. Sato, Marcel Dekker, New York (2001).
- 5) 村勢則郎, 佐藤清隆 編, 「食品とガラス化・結晶化技術」, サイエンスフォーラム, 東京 (2000).
- 6) M. Suzuki *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **62**, 1600–1604 (1985).
- 7) K. Sato and M. Suzuki, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **63**, 1356–1359 (1986).
- 8) F. Kaneko *et al.*, *J. Phys. Chem. B* **101**, 1803–1809 (1997).
- 9) M. Kobayashi, *J. Phys. Chem.* **90**, 6371–6378 (1986).
- 10) K. Sato, “*Advances in Applied Lipid Research*”, Vol. 2, (Chap. 2) edited by F. Padley, JAI Press Inc., London (1996).
- 11) 河田昌子, 「お菓子「こつ」の科学」 (6章) 柴田書店, 東京 (2013).
- 12) S. T. Becket, 「チョコレート科学」 (6章) 古谷野哲夫 訳, 光琳, 東京 (2007).
- 13) 佐藤清隆, 古谷野哲夫, 「カカオとチョコレートのサイエンス・ロマン」 (11章) 幸書房, 東京 (2011).

- 14) K. Larsson, *Acta Chem. Scand.* **20**, 2255-2260 (1966).
- 15) 上野 聡, 他, *放射光* **11**, 208-218 (1998).
- 16) L. Bayes-Garcia, *et al.*, *Cryst. Eng. Commun.* **15**, 302-314 (2013).
- 17) K. Sato *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **66**, 664-674 (1989).
- 18) T. Koyano *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **66**, 675-679 (1989).
- 19) J. Yano *et al.*, *J. Phys. Chem.* **97**, 12967-12973 (1993).
- 20) J.B. Mechelen *et al.*, *Acta Cryst.B*, **62**, 1121-1130 (2006).
- 21) T. マッキー, J. R. マッキー, 「マッキー生化学 第4版」(11章), 市川 監修, 福岡 監訳, 化学同人 (2010).
- 22) G. van Meer and A. I. P. M. de Kroon, *J. Cell. Sci.* **124**, 5-8 (2011).
- 23) S. J. Singer and G. L. Nicolson, *Science* **175**, 720-731 (1972).
- 24) K. Simons and E. Ikonen, *Nature* **387**, 569-572 (1997).
- 25) E. London, *Biochim. Biophys. Acta* **1746**, 203-220 (2005).
- 26) 鈴木健一, 楠見明弘, *生物物理* **53**, 295-300 (2013).
- 27) G. van Meer, *EMBO J.* **24**, 3159-3165 (2005).
- 28) L. Yetukuri *et al.*, *Mol. BioSyst.* **4**, 121-127 (2008).
- 29) M. Elder *et al.*, *Proc. R. Soc. Lond. A* **354**, 157-170 (1977).
- 30) R. H. Pearson and I. Pascher, *Nature* **281**, 499-501 (1979).
- 31) D. Marsh, *Biophys. J.* **55**, 1093-1100 (1989).
- 32) H. Takahashi, *JPS Conf. Proc.* **1**, 012041 (2014).
- 33) J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, 3<sup>rd</sup> Edition (Chap. 20), Academic Press (2011).
- 34) A. Ortiz *et al.*, *Biophys. J.* **77**, 2003-2014 (1999).
- 35) K. Tsuchida and I. Hatta, *Biochim. Biophys. Acta* **945**, 73-80 (1988).
- 36) K. A. Riske *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 954-963 (2009).
- 37) T. Heimburg, *Biophys. J.* **78**, 1154-1165 (2000).
- 38) D. Marsh, *Handbook of Lipid Bilayers*, 2<sup>nd</sup> Edition, CRC Press (2013).
- 39) M. Caffrey and J. Hogan, *Chem. Phys. Lipids* **61**, 1-109 (1992).
- 40) R. Koynova and M. Caffrey, *Chem. Phys. Lipids* **69**, 1-34 (1994).
- 41) T. Heimburg, *Thermal Biophysics of Membranes* (Chap. 4), Wiley VCH (2007).
- 42) S. Leekumjorn and A. K. Sum, *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 354-365 (2007).
- 43) S. G. Goto *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 1251-1254 (2010).
- 44) R. N. A. H. Lewis *et al.*, *Biochemistry* **28**, 541-548 (1989).