説

解

# 圧力摂動熱量測定:脂質膜への適用

玉井 伸岳, 後藤 優樹, 松木 均

徳島大学 大学院社会産業理工学研究部 生物資源産業学域

(受取日:2019年1月29日,受理日:2019年3月3日)

# **Pressure Perturbation Calorimetry: Application to Lipid Membranes**

Nobutake Tamai, Masaki Goto, and Hitoshi Matsuki

Division of Bioscience and Bioindustry, Graduate School of Technology, Industrial and Social Sciences, Tokushima University

(Received Jan. 29, 2019; Accepted Mar. 3, 2019)

Pressure perturbation calorimetry (PPC) is a novel calorimetric technique which allows us to obtain information about volumetric properties of solute molecules and colloidal particles in aqueous solutions. A PPC calorimeter has basically the same architecture as a high-sensitivity power-compensation differential scanning calorimeter, but it can measure the heat quantity transferred from or into a sample solution during the course of an isothermal small pressure change by attaching an external accessary for pressure control to the calorimeter. This heat quantity can be related to the expansion coefficient  $\alpha$ , and thus, the temperature dependence of  $\alpha$  can be obtained by performing PPC scans at a series of different temperatures. This article describes the application of PPC to the investigation of volume behavior of phospholipid bilayer membranes on the basis of our previous studies along with the general thermodynamic background of the PPC technique. We also give a concise explanation of how to analyze the PPC data, because we modified the conventional data analysis method to evaluate the absolute values of volume changes with bilayer phase transitions. Keywords: pressure perturbation calorimetry (PPC), lipid membrane, volume behavior, apparent molar volume, thermal expansivity.

76

## 1. はじめに

物質の体積 Vは、その構造に密接に関連した物理量であ り、絶対値を実験的に決定できる数少ない示量性熱力学変 数の一つである。密度法は Vを決定する代表的な実験手法 であり、これまで様々な高分子溶液やコロイド分散系の体 積挙動の研究に用いられてきた。しかし、溶質の部分モル 体積 いを決定するためには、溶液(または分散液)と溶媒 (または分散媒)との密度差を正確に決定する必要があり、 特に希薄系の場合、この密度差は非常に小さいため、信頼 性の高い結果を得るためには、mK(10<sup>-3</sup>℃)オーダーでの 温度制御など非常に高精度な測定が要求される。そのため、 詳細な体積挙動に関する研究はこれまで一般的に敬遠され がちであった。

今世紀に入り, 圧力摂動熱量法 (PPC 法) と呼ばれる市 販の熱量計をベースとした新たな測定手法が開発された。 PPC 法の熱力学的原理は古くから知られていたが,<sup>1)</sup> 市販 の装置として Microcal 社が提供し始めたことにより,<sup>2)</sup> 一般的な熱量測定法の一つとして普及するようになった。 PPC 熱量計は,外部に圧力制御モジュールを装着している 点を除けば,基本的に熱補償型示差走査熱量計 (DSC 熱量 計) と同じ構造を有しており,一定温度下における瞬間的 な微小圧力変化  $\Delta P$  に伴い発生(または吸収)する熱を時 間 t の関数として測定することができる。この過程で生じ た全熱量  $\Delta q$  は、熱膨張率  $\alpha$ に関係付けられることから、一 連の異なる温度 T で PPC 測定を行うことにより、 $\alpha$ の温度 依存性を精度よく決定できる。Vの一次導関数である $\alpha$ を実 験的に直接決定できる点が PPC 法の最大の利点である。二 成分溶液系に対して適用した場合、溶液と溶媒に対する  $\Delta q$ の差  $\Delta \Delta q$  から溶質の見かけのモル体積  $\varphi_2$  に対する熱膨張 率 $\alpha_2$  (=  $1/\varphi_2(\partial \varphi_2/\partial T)_P$ ) が得られる。

これまで我々の研究室では、様々なリン脂質が水中で自 発的に形成する二分子膜に対して高圧相挙動の観測および 相転移熱力学量の決定を行い、二分子膜物性と構成リン脂 質分子の化学構造との関連性について系統的に研究してき た。<sup>3-5)</sup> これらの研究において、二分子膜相転移に伴う体積 変化  $\Delta V$  は相転移温度の圧力依存性 dT/dP および転移エン タルピー  $\Delta H$  の値を Clapeyron の式に適用することで算出 してきた。一方、 $\Delta V$  の値は、相転移前後での二分子膜中に おけるリン脂質の  $\varphi_2$  の差として直接決定することもでき る。本稿では、PPC 法の熱力学的原理および測定結果の解 析方法について簡単に説明し、これまでに我々の研究室で 行なってきたリン脂質二分子膜の体積挙動に関する研 究<sup>6,7)</sup> をもとに、リン脂質ベシクル分散液に対する PPC 法 の適用について概説する。

### 2. 圧力摂動熱量法

**PPC** 法の熱力学的原理についてはいくつかの論文<sup>1,7)</sup> に 記されているので,詳細についてはそれらを参照頂きたい。 T - 定下における可逆変化に伴う孤立系のエントロピー変化 dS は,系に供給される熱量 dqr と dqr = TdS により関係付けられる。両辺を <math>P で微分し,Maxwellの関係式 ( $\partial S/\partial P$ )<sub>T</sub> =  $- (\partial V/\partial T)_P$ を適用すると次式を得る。

$$\left(\frac{\partial q_r}{\partial P}\right)_T = T \left(\frac{\partial S}{\partial P}\right)_T = -T \left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P = -\alpha T V \tag{1}$$

ここで $\alpha = (1/V)(\partial V/\partial T)_P$ である。PPC 測定において系全体の体積 V は PPC 熱量計のセル体積 V に相当する。

測定対象となる試料が, n1 mol の溶媒(成分 1) と n2 mol の溶質(成分 2) からなる二成分溶液の場合,溶液の全体積 Vs は溶媒のモル体積 v1°とφ2を用いて

$$V_{\rm s} = n_1 v_1^{\circ} + n_2 \varphi_2 \tag{2}$$

と表される。ここで、上付き添え字の「°」および下付きの 添え字の s はそれぞれ純物質および溶液に対する熱力学量 を表す。式(2)の両辺を、P 一定の条件下 T で微分すると、  $\alpha V_s = n_l v_l^{\circ} \alpha_l^{\circ} + n_2 \varphi_2 \alpha_2$  (3)

となる。ここでαι°は純溶媒の熱膨張率である。式(3)を式(1) に代入すると次式を得る。

$$\left(\frac{\partial q_{rs}}{\partial P}\right)_{T} = -T(n_{1}v_{1}\circ\alpha_{1}\circ+n_{2}\varphi_{2}\alpha_{2})$$
(4)

一方,全体積 V1の純溶媒に対しては,

$$\left(\frac{\partial q_{r,1}}{\partial P}\right)_{T} = -\alpha_{1}^{\circ} T V_{1}$$
(5)

が成立する。PPC 測定において溶液および溶媒の体積は熱 量計のセル体積で規定されるので、

 $V_{\rm s} = V_{\rm I} \equiv V_{\rm C} \tag{6}$ 

を満たす。式(2)と式(6)を式(5)に代人して, 
$$(\partial a_{\perp})$$

$$\left(\frac{\partial q_{r,1}}{\partial P}\right)_{T} = -\alpha_{1}^{\circ} T \left(n_{1} v_{1}^{\circ} + n_{2} \phi_{2}\right)$$
<sup>(7)</sup>

を得る。さらに式(4)から式(7)を引き,n2を c2Vc(c2:モル 濃度)で置き換えれば,

$$\left[\frac{\partial}{\partial P}(q_{r,s}-q_{r,1})\right]_{T} = -(\alpha_{2}-\alpha_{1}^{\circ})Tc_{2}V_{C}\varphi_{2}$$
(8)

となる。温度一定下における有限の微小圧力変化ΔPに対して,式(8)は以下のように近似できる。

$$\frac{\Delta\Delta q_{\rm r}}{\Delta P} = -(\alpha_2 - \alpha_1^{\circ})Tc_2V_{\rm c}\varphi_2 \iff \alpha_2 = \alpha_1^{\circ} - \frac{\Delta\Delta q_{\rm r}}{\Delta PTc_2V_{\rm c}\varphi_2} \tag{9}$$

なお $\Delta \Delta q_r = \Delta q_{r,s} - \Delta q_{r,1}$ である。式(9)からわかるように,溶 液および溶媒に対する PPC 測定からそれぞれ $\Delta q_{r,s} \ge \Delta q_{r,1}$ が 得られれば, $\alpha_2$ の値を決定することができる。ただし,PPC 測定を行なう全ての温度における $\alpha_1$ °の値と,その中のある 温度における $\varphi_2$ の値が既知であることが前提となる。

次に、測定結果の解析方法について簡単に説明しよう。 被測定物質が一次相転移(あるいはそれに準ずる状態変化) を起こす場合、一連の異なる温度  $T_n$  (n=1,2,3...) で行な った PPC 測定の結果をもとに作成した $\alpha_2$  の温度依存性曲 線 ( $\alpha_2(T)$ とする) には、相転移温度近傍に相転移に伴う体 積の不連続な変化に起因したピークが現れる。通常の解析 方法では、DSC 測定の結果に対する解析方法と同様、ベー スライン ( $\alpha_{2,base}(T)$ とする) を引きビーク面積を算出する。 ここで一例として、Fig.1(a)に示すように、ピーク温度  $T_m$ の 上下で、それぞれ値の異なる水平線をベースラインとして 設定した場合について計算してみよう。この場合、 $\alpha_{2,base}(T)$ は、

$$\alpha_{2,\text{base}}(T) = \begin{cases} \alpha_{2,\text{base,below}}(T) = \alpha_2(T_i) & (T_i \le T \le T_m) \\ \alpha_{2,\text{base,above}}(T) = \alpha_2(T_f) & (T_m \le T \le T_f) \end{cases}$$
(10)

と書ける。ピークの開始および終了温度をそれぞれ  $T_i$ ,  $T_f$  とすると、ピーク面積Aは、

$$A = \int_{T_{i}}^{T_{m}} \left[ \alpha_{2}(T) - \alpha_{2,\text{base,below}}(T) \right] dT + \int_{T_{m}}^{T_{f}} \left[ \alpha_{2}(T) - \alpha_{2,\text{base,above}}(T) \right] dT$$
(11)

で与えられる。この積分を計算するために、ここで次式に より $\alpha_{2,base}(T)$ と関連付けられる見かけのモル体積 $\varphi_{2,base}(T)$ を導入する。

$$\alpha_{2,\text{base}}(T) = \frac{1}{\varphi_{2,\text{base}}(T)} \left( \frac{\partial \varphi_{2,\text{base}}(T)}{\partial T} \right)_{P}$$
(12)

 $\varphi_{2,\text{base,below}}(T_i) = \varphi_2(T_i)$ 

$$\varphi_{2,\text{base,above}}(T_f) = \varphi_2(T_f)$$
(13)

を満たすものとする。圧力一定の条件下では一般にαは

$$\int_{\tau_{1}}^{\tau_{2}} \alpha(T) dT = \int_{\tau_{1}}^{\tau_{2}} \frac{1}{V(T)} \left( \frac{\partial V(T)}{\partial T} \right)_{p} dT = \int_{\tau_{1}}^{\tau_{2}} \frac{1}{V(T)} dV(T)$$

$$= \ln \frac{V(T_{2})}{V(T_{1})} \approx \frac{V(T_{2}) - V(T_{1})}{V(T_{1})}$$
(14)



Temperature

**Fig.1** Schematic illustrations for the analysis of PPC data: temperature dependence of (a) thermal expansion coefficient  $\alpha_2$ and (b) ln  $\varphi_2$  ( $\varphi_2$ : apparent molar volume of phospholipid). In the case that the baseline is set by a pair of horizontal line segments, the peak area is approximately equal to the relative volume change  $\Delta \varphi_2 / \varphi_{2,base,below}$  ( $T_m$ ), which is shown by a dashed line between the points A and B. Temperature dependence curves of ln  $\varphi_{2,base,below}$  and ln  $\varphi_{2,base,above}$  are also shown by dotted lines. と積分できるので、この結果を用いると式(11)は容易に計算でき、最終的に以下の結果を得る。

$$A = \ln \frac{\varphi_{2,\text{base,above}}(T_{\text{m}})}{\varphi_{2,\text{base,below}}(T_{\text{m}})} \approx \frac{\Delta \varphi_2}{\varphi_{2,\text{base,below}}(T_{\text{m}})}$$
(15)

ここでΔφ2 は相転移に伴う見かけのモル体積の不連続な変化に相当し,

$$\Delta \varphi_2 = \varphi_{2,\text{base,above}}(T_{\text{m}}) - \varphi_{2,\text{base,below}}(T_{\text{m}})$$
(16)

で与えられる。式(15)からわかるように、ピーク面積に基づ く解析方法から得られる情報は、相転移に伴う相対的な体 積変化の近似値である。そのため一般に PPC 測定では、相 転移に伴う体積変化の絶対値は決定できないと思われがち であるが、式(16)を用いれば容易にその絶対値、すなわち Δφ2 の値を決定できる。そこで次にその手順について説明 しよう。

**Fig.1(b)**には、PPC 測定で得られた $\alpha_2(T)$ から再現した ln  $\varphi_2(T)$ 曲線を示している。上述のとおり、測定温度範囲内のある温度における $\varphi_2$  の値が既知であることが PPC 測定を行なう前提条件であるので、その値を用いれば、漸化式  $\ln \varphi_2(T_n) = \ln \varphi_2(T_{n-1}) + \alpha_2(T_{n-1})\Delta T$  (17) より、PPC 測定を行なった全ての温度に対して ln  $\varphi_2$ の値を計算することができる。ここで  $T_n$  は n 回目の PPC 測定を

計算することかできる。ここで  $I_n$ は n 回目の PPC 測定を 行なった温度で、 $\Delta T_n$ は n 回目と n-1 回目の測定温度の差 を表す。転移温度近傍に見られる ln  $\varphi_2$ の急激な増加は $\Delta \varphi_2$ に起因しているが、この増分そのものは式(15)のピーク面 積に等しい。しかし、図中の点 A と点 B での値、すなわち ln  $\varphi_{2,base,below}(T_m)$ と ln  $\varphi_{2,base,above}(T_m)$ の値がそれぞれ個別にわ かれば、式(16)に基づいて $\Delta \varphi_2$ の絶対値を算出することがで きる。こういった場合、通常、接線を引くなど作図的な作 業が必要となるが、温度  $T_i$ および  $T_f$ における ln  $\varphi_2(T)$ 曲線 の接線の傾きはそれぞれ $\alpha_2(T_i)$ 、 $\alpha_2(T_f)$ に等しいことを考え れば、これらの値は次式を用いて容易に計算できる。

$$\ln \varphi_{2,\text{base,below}}(T_{\text{m}}) = \alpha_{2}(T_{\text{i}})(T_{\text{m}} - T_{\text{i}}) + \ln \varphi_{2}(T_{\text{i}})$$
(18)

 $\ln \varphi_{2,\text{base,above}}(T_{\text{m}}) = \alpha_2(T_{\text{f}})(T_{\text{m}} - T_{\text{f}}) + \ln \varphi_2(T_{\text{f}})$ 

計算結果よりφ<sub>2,base,below</sub>(*T*<sub>m</sub>)とφ<sub>2,base,above</sub>(*T*<sub>m</sub>)の値を求め,式 (16)に代入すれば,最終的に作図に起因した個人誤差を含 まず一義的にΔφ<sub>2</sub>の値を決定することができる。

#### 3. リン脂質二分子膜の体積挙動

モデル膜研究において代表的なリン脂質の一つであるジ パルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) のベシクル分 散液に対して,温度範囲 15-60 °C,温度間隔∆T=0.2 °Cの 条件下で行なった PPC 測定から得られた熱膨張率α₂の温 度依存性(以後 PPC 曲線と呼ぶ)を Fig.2 に示す。前節で 述べたように、PPC 測定から得られるα2 は溶質の見かけの モル体積φ2に対する熱膨張率であるので、この結果は二分 子膜中における DPPC 分子の熱膨張率の温度依存性を表し ている。図からわかるように、ショルダー様の不規則な変 化が 34 ℃ 付近に,また鋭い大きなピークが約 42 ℃ に観 測される。これらの温度は、DPPC 二分子膜の前転移(ラメ ラゲル (L<sub>b</sub>') 相からリップルゲル (P<sub>b</sub>') 相への転移) およ び主転移(Pβ'相から液晶(Lα)相への転移)の温度に一 致する。3)前者は脂質分子の再配列に伴う転移であり、後者 は炭化水素鎖の熱融解(トランス-ゴーシュ異性化)に起因 した転移である (Fig.3(a))。したがって、これらの特徴的な α2の変化はそれぞれの相転移に伴う不連続な体積変化に 起因する。6回の独立した PPC 測定の結果に対して、従来 の解析法に従い主転移ピークの面積を見積もったところ、 0.0327±0.00327 であることがわかった。このことは、二分 子膜中における DPPC の φ2 値は主転移に伴い 3.27±0.327%



**Fig.2** Temperature dependence of thermal expansion coefficient  $\alpha_2$  (*i.e.*, PPC curve) obtained from PPC measurements: (a) total view of the PPC curve for DPPC; (b) magnified view of (a) to show the variation of low- $\alpha_2$  data clearly.



**Fig.3** Schematic representation of thermotropic bilayer phase transitions for DPPC (a), DMPC (a) and DHPC (b). The abbreviations for each phase state are as follows:  $L_{\beta}$ : lamellar gel phase;  $L_{\beta}$ : interdigitated gel phase;  $P_{\beta}$ ': ripple gel phase;  $L_{\alpha}$ : liquid crystalline phase.

増加することを意味する。一方,前転移に関しては明瞭な ピークが観測できなかったことから、PPC 測定の結果をも とにその体積変化を正確に定量するのは非常に困難である。 いくつかの文献 8.9)において同様の報告がなされているが, 明確な原因は未だに不明である。P<sub>B</sub>'相の状態でのα2 値が, 他の相状態におけるα2 値よりも大きいことがその一因と も考えられるが、前転移の本質的な性質に起因しているの かも知れない。同様の傾向は、炭素数14のアシル鎖を二本 持つジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC) およ び DPPC と同じ炭素数 16 のアルキル鎖を二本持つジヘキ サデシルホスファチジルコリン (DHPC) の形成する二分子 膜においても観察された。DHPC 二分子膜の前転移は指組 ゲル(L<sub>β</sub>I)相から P<sub>β</sub>'相への転移であり, L<sub>β</sub>I 相の状態では, 二分子膜を構成する互いに向き合った二枚の単分子層の炭 化水素鎖部分が相互貫入した非二分子膜構造が形成されて いる (Fig.3(b))。<sup>10)</sup>なお, DMPC および DHPC 二分子膜の 主転移ピークの面積はそれぞれ 0.0277 ± 0.00077, 0.0321 ± 0.00041 であった。DPPC 二分子膜の結果とともにこれらの 値を Table 1 にまとめておく。

**Table 1**Volume properties of the main transition obtained fromPPC measurements.

Lipid	Peak area	$\Delta \phi_2 \ / \ cm^3 \ mol^{-1}$
DPPC	$0.0327 \pm 0.00327$	$23.5\pm2.33$
DMPC	$0.0277 \pm 0.00077$	$18.0\pm0.69$
DHPC	$0.0321 \pm 0.00041$	$23.0\pm0.33$

次に, 主転移に伴う体積変化の絶対値を見積もるため, 我々の提唱する解析法を適用した結果について説明しよう。 Fig.4 には漸化式(17)を用いて、PPC 曲線から再現した ln φ2(T)曲線を実線で示している。なお、繰り返し計算のた めの初期値として, DPPC, DMPC および DHPC 二分子膜 のそれぞれに対して ln  $\varphi_2(T_0) = 6.5581$  (T<sub>0</sub> = 36 °C), 6.4945 (T<sub>0</sub>=30°C), 6.5484 (T<sub>0</sub>=37°C)を用いた。なおこれら の値は密度測定から決定したものである。いずれの二分子 膜においても主転移温度近傍で急激に ln φ2 が増加してい ることがわかる。この急激な増加は、PPC 曲線でのピーク に対応し、主転移に伴う不連続な体積変化Ao2に起因する。 ln φ2(T)曲線をもとに式(16)を用いて主転移に伴うΔφ2 を 算出した結果, DPPC 二分子膜では 23.5 ± 2.33 cm<sup>3</sup>mol<sup>-1</sup>, DMPC 二分子膜では 18.0 ± 0.69 cm<sup>3</sup>mol<sup>-1</sup>, DHPC 二分子膜 では 23.0 ± 0.33 cm<sup>3</sup>mol<sup>-1</sup>であった(**Table 1**)。これらの結 果は, 以前の研究 <sup>3,4</sup>において実験的に決定した主転移に伴 うエンタルピー変化ΔHmと主転移温度の圧力依存性dTm/dP より Clapeyron 式  $(dT_m/dP = \Delta v_2/T_m \Delta H_m)$  を用いて算出した 体積変化Δv2 の値, 25.4 cm<sup>3</sup>mol<sup>-1</sup> (DPPC 二分子膜), 17.6 cm<sup>3</sup>mol<sup>-1</sup> (DMPC 二分子膜), 25.3 cm<sup>3</sup>mol<sup>-1</sup> (DHPC 二分子 膜)とよく一致する。このことは、PPC 測定結果の信頼性 および我々の提唱する解析法の妥当性を支持する。また dTm/dP の決定には高圧用実験機器が必要であることを考 えれば, 簡便にΔφ2値を決定できる点は PPC 法の利点の一 つと言える。なお、リン脂質ベシクル分散液の場合、通常、

 $\varphi_2$ は近似的に部分モル体積 $v_2$ に等しいとみなせる。両者は ( $\partial \varphi_2$ )

$$v_2 = \varphi_2 + n_2 \left(\frac{\varphi_{\Psi_2}}{\partial n_2}\right)_{T,P,m_1} \tag{19}$$

によって関係付けられ、リン脂質濃度  $10^{-3} \sim 10^{-2} \operatorname{mol} \operatorname{kg}^{-1}$ 程 度では、 $n_2$  (リン脂質のモル数) が十分小さく、加えて右辺 第 2 項の微分係数が非常に小さい ( $(\partial \varphi_2/\partial n_2)_{T,P,n1} \approx 0$ )。した がって、 $\Delta \varphi_2$ は相転移に伴う $\Delta v_2$ と等価であると考えて差し 支えない。



**Fig.4** Temperature dependence of  $\ln \varphi_2$  ( $\varphi_2$ : apparent molar volume) for DPPC (curve 1), DMPC (curve 2) and DHPC (curve 3) in bilayer membrane. These curves were obtained from the repeating calculation using Eq.(17). Symbols ( $\circ$ ) indicate the data obtained from density measurements.

Δφ2の絶対値を算出できたことで, 逆に, 従来の解析法, すなわちピーク面積から算出した体積変化の相対値Δφ2/φ2 の近似値の精度を確認することができる。つまり、我々の 解析法により算出したΔφ2 値を用いて,数学的近似を含ま ないΔφ2/φ2を計算すれば、ピーク面積から見積もった Δφ2/φ2 値がどの程度正確(あるいは不正確)であるかを確 認することができる。実際に計算してみると、DPPC 二分 子膜では 0.0332 ± 0.00338, DMPC 二分子膜では 0.0281 ± 0.00111, DHPC 二分子膜では 0.0327 ± 0.00042 であった。 Table 1 に示したピーク面積と比較すると、 $\Delta \phi_2$  値に関して、 概ね 1.5%程度の誤差が数学的近似により生じることがわ かる。高精度の結果が要求される場合には、やはり解析法 を工夫し、Δφ2値を正確に算出するべきである。しかしそう でなければ,数学的近似による誤差は無視してもよいだろ う。ただし、ピーク面積にφ2を掛けてΔφ2値を推定する場 合には、数学的近似に由来する誤差よりむしろ、乗ずる q2 の値の不正確さのほうが推定値の精度に大きく影響するこ とを認識しておくべきである。

最後に, PPC 測定の結果をもとに再現した ln φ<sub>2</sub>(T)曲線の 精度に関するいくつかの特徴について触れておこう。Fig.4 には精密密度測定から得られたφ2(T)値をプロットで示し ている。両測定結果の比較から,第一に, PPC 測定のほう が、主転移に伴う ln φ2の不連続な変化をより明確に観測で きることがわかる。このことは、PPC 法ではより正確に転 移温度を決定できることを意味している。もちろんこれは 測定温度間隔に依存するので、密度測定においても測定温 度間隔を小さくすれば、PPC 測定の結果と同様に不連続な 変化を明確に捉えることは可能である。しかし PPC 法の利 点の一つである測定の簡便さを考慮すれば、この点もまた PPC 法の優位性として認めてもよいだろう。第二の特徴は, PPC 測定から得た ln φ2(T)曲線には前転移に伴う体積の不 連続な変化がほとんど見られないことである。これは、上 述したとおり、PPC 測定ではリン脂質二分子膜の前転移を 明瞭なピークとして観測できなかったことに対応する。

方,密度測定の結果には、小さいながらも前転移に伴う体 積の不連続な変化を反映した階段状の ln  $\varphi_2$  の変化が確認 できる。原因は不明であるが、少なくとも PPC 法を脂質膜 系へ適用する際には、測定結果の精度を損なう一因として 認識しておく必要がある。なお参考までに、以前の研究<sup>3,4)</sup> において Clapeyron の式を用いて算出した前転移に伴う体 積変化は、DPPC 二分子膜では 1.9 cm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>, DMPC 二分子 膜では 1.8 cm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>, DHPC 二分子膜では 5.3 cm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> であ る。これらはそれぞれ、前転移温度近傍での $\varphi_2$  値の 0.27%、 0.28 %および 0.76%に相当する。

Table 2Numerical data of apparent molar volumes atdifferent temperatures.

Temp. —	$\varphi_2 / cm^3 mol^{-1}$			
	DI	PPC	Dł	HPC
20 °C	692.5	(688.9) <sup>a</sup>	684.7	(677.4) <sup>b</sup>
37 °C	706.3	(709.4) <sup>b</sup>	698.5	(697.3) <sup>b</sup>
45 °C	738.9	(736.5) <sup>b</sup>	728.0	(734.6) <sup>b</sup>
48 °C	741.9	(— )	731.6	(736.5) <sup>a</sup>
50 °C	743.7	(740.1) <sup>a</sup>	732.8	(-)

Values in parentheses are taken from literature:

<sup>a</sup>Guler et al. (2009)<sup>11</sup>, <sup>b</sup>Laggner et al. (1987)<sup>10</sup>.

第三の特徴として、両測定から算出された ln φ2 値が概ね よく一致する点が挙げられる。PPC 法の原理を考えると, このことは非常に重要なことである。前節で述べたとおり, **PPC** 法の熱力学的原理では,可逆過程(すなわち dqr = TdS) を前提として最終的に式(8)あるいは式(9)を導いている。し かし実際の PPC 測定において適用される圧力変化はガス 圧を利用した瞬間的な減圧または加圧であり、これは明ら かに不可逆過程(すなわち dqr < TdS) である。つまり, PPC 法は原理的に測定結果に不正確さを生じさせる不可避な要 因を含有しているのである。したがって、PPC 測定の結果 をもとに精密な体積特性の解析を行なう際には、この原理 的矛盾が測定結果にどの程度影響を与えるかを把握してお かなければならない。この点を考慮したうえで、両測定結 果を改めて比較した結果, DPPC, DMPC および DHPC 二 分子膜に対する全ての結果を含めて、前転移温度以下では 相対誤差約0.6%以内で,前転移温度以上では,主転移温度 近傍の結果を除けば相対誤差約 0.5 %以内で一致すること がわかった。さらに Table 2 には、いくつかの温度での DPPC と DHPC のφ2 値に関して文献値<sup>10,11)</sup>とともに列挙してい る。文献値との比較からも、少なくともリン脂質二分子膜 系への適用に関する限り, PPC 法は誤差1%以内の精度で 体積特性の定量的評価に用いることができると結論付けて よいだろう。

#### 4. おわりに

本稿では、DPPC、DMPC および DHPC 二分子膜の体積 挙動に関する研究結果をもとに、比較的新規な熱量測定法 である PPC 法の脂質膜系への適用について、測定原理およ び解析方法を含めて概説した。一般に PPC 測定からは体積 変化の相対値 $\Delta \varphi / \varphi _2$  しか得られないと思われがちであるが、 解析方法を工夫することでその絶対値  $\Delta \varphi _2$  を見積もるこ とができる。また精密密度測定の結果との比較から、PPC 測定の精度は非常に高いことがわかった。少なくとも脂質 膜系への適用に関する限り、体積特性の精密な定量的評価 に適用可能な測定手法であるといえる。一般に、溶液中の 溶質の体積変化を精密に測定するのは非常に難しく,また 適用可能な実験手法もかなり限られていることを考えれば, PPC 法は非常に有効な手法であるといえるだろう。実際, 脂質膜系以外にも、タンパク質溶液をはじめ、様々な生体 分子の体積特性評価への適用についても多数報告されてい ることからもその有用性が窺い知れる。<sup>12)</sup>また本稿では触 れなかったが,PPC 法を利用したリン脂質二分子膜の緩和 動力学に関する研究もいくつか報告されており、<sup>13-15)</sup>PPC 法には、本来の体積挙動の評価とは全く異なった適用法も 考案されている。それらについては別の機会に述べること としたい。

### 文 献

- L.-N. Lin, J. F. Brandts, J. M. Brandts, and V. Plotnikov, *Anal. Biochem.* **302**, 144-160 (2002).
- 2) S. L. Randzio, Thermochim. Acta 398, 75-80 (2003).
- 3) H. Ichimori, T. Hata, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Biochim. Biophys. Acta* 1414 165-174 (1998).
- H. Matsuki, E. Miyazaki, F. Sakano, N. Tamai, and S. Kaneshina, *Biochim. Biophys. Acta* 1768 479-489 (2007).
- H. Matsuki, S. Endo, R. Sueyoshi, M. Goto, N. Tamai, and S. Kaneshina, *Biochim. Biophys. Acta* 1859, 1222-1232 (2017).
- T. Izumikawa, Y. Nambu, K. Fujishige, M. Goto, N. Tamai, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *J. Phys. Conf. Ser.* 215, 12163 (2010).
- N. Tamai, Y. Nambu, S. Tanaka, M. Goto, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Colloid Surf. B: Biointerf.* 92, 232-239 (2012).
- 8) H. Heerklotz, J. Seelig, Biophys. J. 82, 1445-1452 (2002).
- S.-L. Wang and R. M. Epand, *Chem. Phys. Lipids* 129, 21-30 (2004).
- P. Laggner, K. Lohner, G. Degovics, K. Müller, and A. Schuster, *Chem. Phys. Lipids* 44, 31-60 (1987).
- S. D. Guler, D. D. Ghosh, J. Pan, J. F. Mathai, M. L. Zeidel, J. F. Nagle, and S. Tristram-Nagle, *Chem. Phys. Lipids* 160, 33-44 (2009).
- S. Kidokoro and S. Nakamura, *Methods Enzymol.* 567, 391-412 (2016).
- 13) P. Grabitz, V. P. Ivanova, and T. Heimburg, *Biophys. J.* 82, 299-309 (2002).
- 14) M. Schiewek and A. Blume, *Eur. Biophys. J.* **39**, 815-824 (2010).
- 15) N. Tamai, S. Kakibe, S. Tanaka, M. Goto, and H. Matsuki, *High Press. Res.* **33**, 271-277 (2013).



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

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



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