解 説

リン脂質二重膜相転移の熱力学的研究

松木 均

徳島大学大学院 社会産業理工学研究部

(受取日:2020年1月27日,受理日:2020年3月31日)

Thermodynamic Study on Phase Transitions of Phospholipid Bilayer Membranes

Hitoshi Matsuki

Graduate School of Technology, Industrial and Social Sciences, Tokushima University

(Received Jan. 27, 2020; Accepted Mar. 31, 2020)

Phospholipid bilayer membranes undergo structural changes called phase transitions in response to various external environmental factors. They exhibit markedly complicated phase behavior due to the nonhomogeneous structures. We have investigated the bilayer phase transitions of various phospholipids with different molecular structures to elucidate the environmental adaptation of biological membranes. The constructed thermodynamic phase diagrams of the phospholipid bilayer membranes have revealed the correlation between the lipid molecular structures and the thermotropic and barotropic bilayer phase behavior. In this review, several types of bilayer phase behavior of representative glycerophospholipids contained in biological membranes, saturated diacyl-posphatidylcholines (PCs), - phosphatidylethanolamines (PEs) and -phosphatidylglycerols (PGs), are explained, and subsequently our lipid membrane studies based on the bilayer phase diagrams, formation of nonbilayer phases (chain interdigitation for saturated diacyl-PCs and inverted hexagonal transformation for unsaturated diacyl-PEs) and fluorescence imaging of bilayer packing for saturated diacyl-PCs, are introduced.

Keywords: calorimetry, fluorescence imaging, high pressure, phospholipid bilayer membrane, phase diagram, phase transition.

1. はじめに

生体膜は細胞内外を隔離する細胞膜と細胞内小器官を構 成する内外膜の総称である。生体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重膜構造 の閉鎖型小胞体を構築する。このため、リン脂質二重膜は 生体膜のモデルとして, 生命科学研究はもとより, 物理化 学的基礎研究など様々な研究に幅広く利用されている。 リン脂質二重膜の最も大きな特徴は、その周囲の環境変化 に鋭敏に応答して集合体構造が変化し、いわゆる相転移と 呼ばれる構造変化を引き起こすことである。リン脂質二重 膜は,その非等方的な構造に起因して安定相, 準安定相, 相の多形、温度・圧力に依存した相転移の履歴現象(ヒス テリシス)などを示すことが知られている。したがって、 リン脂質二重膜においては、一般に相がほとんど安定相と して存在する等方性物質における相転移とは全く異なり, 非常に複雑な相挙動が出現する。

我々は,生体膜の環境適応性の解明を目的に,リン脂質 二重膜を生体膜モデル系として用いて,示差走査熱量(DSC) 測定を中心とした熱測定と分光(光透過率および蛍光)測 定に基づく高圧測定によりリン脂質二重膜相転移を調査し, 得られた温度および圧力誘起の相転移データを元に構築し た熱力学的な温度(T)-圧力(p)相図から脂質分子構造と 相状態の相関を考察してきた。単一のリン脂質が形成する 二重膜に対して構築された相図からは相挙動は断片的にし か見えないが、相図を脂質分子構造や実験条件と共に系統 立てて整理、検討することによりリン脂質二重膜に関する 一般的な法則や統一的な見解が見えてくる。本稿では、こ れまでに構築してきたリン脂質二重膜の熱力学的相図の中 から、生体膜中に含まれる代表的なグリセロリン脂質であ る飽和ジアシル-ホスファチジルコリン (PC), -ホスファチ ジルエタノールアミン (PE) および-ホスファチジルグリセ ロール (PG) を選び、これらリン脂質が形成する二重膜が 温度と圧力に依存して取り得る膜状態について説明する。 続いて、熱力学的相図を基盤としたリン脂質二重膜の研究 成果として,非二重膜構造(飽和ジアシル PC 二重膜の指 組み構造ゲル相と不飽和ジアシル PE 二重膜の逆へキサゴ ナル相)の形成および飽和ジアシル PC 二重膜の膜内充填 構造の蛍光イメージングについて紹介する。

2. リン脂質分子構造の相違による 二重膜相状態の変化

生体膜中の主要な脂質は、3価アルコールであるグリセ 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縮合したグリセロリン脂質である (Fig.1(a))。グリセロール骨格に結合する二つの脂肪酸と 極性基の組み合わせにより,多数の脂質分子種が存在する。 赤血球膜に代表される真核生物の生体膜中のグリセロリン 脂質は、PCとPEが主体であり、大腸菌に代表される原核 生物では, PE と PG が主体である。^{1,2)} 生体膜中に見られる リン脂質は、グリセロール骨格の1位に飽和脂肪酸、2位 に不飽和脂肪酸が結合した飽和-不飽和非対称リン脂質が 多数を占めるが,モデル膜研究においては常温・常圧に相 転移が存在する鎖長14のミリスチン酸および鎖長16のパ ルミチン酸を二つ有するジミリストイル鎖およびジパルミ トイル鎖(Fig.1(b))のリン脂質が頻用されている。まず, 両疎水鎖を有する PE, PC および PG 二重膜の熱力学的相 図について順次,説明する。



Fig.1 (a) Molecular structure of glycerophospholipids. (b) 3-D pictures of saturated phospholipids with two palmitic acids in the gel phase: from the top, DPPE, DPPC and DPPG.

ジミリストイル-PE (DMPE) およびジパルミトイル-PE (DPPE)が形成する二重膜のDSC 測定の結果を Fig.2(a),(c) に示す。^{3,4)} 常圧下,両PE二重膜において観測される膜状 態は、水和結晶(L_c)相、ゲル(L_β)相および液晶(L_α)相 である。L。相および Lβ相は脂質試料に対する低温貯蔵の有 無に依存して出現する。1度目の昇温過程の DSC サーモグ ラムには L_c相から直接 L_α相への相転移が観測され, 2度 目の昇温過程ではLβ相からLα相への鎖融解の相転移(いわ ゆる主転移)が観測される。飽和 PE 二重膜では、低温下、 完全にL。相に移行するのに時間を要し、常圧下、Lβ相は準 安定相として存在する。PE 分子が有する小さなサイズのエ タノールアミン基は、親水基間の立体障害が少なく、膜面 に対してアシル鎖が垂直配向する。また、二重膜中で、PE 分子は隣り合う PE 分子と極性基間で分子間水素結合を形 成する。4,5) この極性基間の強い引力的相互作用は,分子充 填の密な膜を形成させ,低温条件下では極性基間の水(層 間水)の脱水和をもたらし、安定なL。相形成に導く。

DMPE および DPPE 二重膜の *T*-*p* 相図を Fig.2(b),(d)に示 す。⁴⁾ 加圧により L_o/L_a転移温度および主転移温度は上昇す るが,主転移の圧力勾配(d*T*/d*p*)値は L_o/L_a転移のものよ りも大きくなる。DMPE 二重膜では,測定圧力範囲で両相 境界線は交差しないが,DPPE 二重膜においては,二つの相 境界線は約 22 MPa で交差し,交差点圧力においてゲル相 の安定性が変化する。すなわち,常圧から約 22 MPa まで の低圧領域では L_β相は準安定相として存在するが,それ以 上の高圧領域においては, L_β相は安定相となる。そのため 常圧下では,熱履歴に依存した一つの相転移のみが観測さ れるが,高圧力下においては L_o/L_β(副)転移および L_β/L_a 転移の二つの連続した相転移が観測される。PE 二重膜は, 後述する PC 二重膜とは異なり,そのゲル相に多形は観測 されない。PE 二重膜の相挙動は,L。相関連転移と主転移の みで規定される比較的単純な相図となる。

Fig.2(e),(g)は、極性頭部にかさ高いコリン基を有するジ ミリストイル-PC (DMPC) およびジパルミトイル-PC (DPPC) が形成する二重膜の DSC 測定の結果である。^{6,7)} 常圧下, PC 二重膜では, 膜面に対して鎖が傾斜配向した2 種類のゲル相(ラメラゲル(L_β)相, リップルゲル(P_β) 相)が観測される。低温から順に起こる L_c/L_{B'}(あるいは L_c/P_β'), L_β/P_β', P_β/L_αの転移をそれぞれ副転移, 前転移, 主 転移と呼び、DSC サーモグラム上の三つの吸熱ピークに対 応する。これら PC 二重膜を L。相に移行させるためにはア ニーリングと呼ばれる熱的前処理が必要とされ,^{8,9}1回目 の昇温後,直ちに実施した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。また、ゲル相は DPPC 二重膜では、常圧下、二つのゲル相共に安定相であるが、 DMPC 二重膜では Lg/相は準安定相である。前転移は、膜内 充填構造のゆらぎに依存した同じゲル相間転移であり、平 面状から波型状の二重膜への変化に対応する。PC 二重膜の ゲル相では、その大きなコリン基のため鎖が膜面に対して 垂直配向できず,膜面より約30度傾斜することで疎水鎖間 の van der Waals 力を強め安定距離を保っている。

DMPC および DPPC 二重膜に対して構築された T-p 相図 を Fig.2(f),(h)に示す。^{6,7)}加圧により3種類の相転移温度は 直線的に上昇し, DMPC 二重膜では約 300 MPa, DPPC 二 重膜では約100 MPa以上の高圧力下,非二重膜構造の指組 み構造ゲル (LβI) 相が誘起される。^{10,11)} Lβ相, Pβ相および L_βI相のようなゲル相の多形現象はPC二重膜の大きな特徴 である。注目すべきは、高圧力下では、Lg/LgI 転移は他の 相転移とは対照的に加圧と共に相転移温度が降下すること である。L_B/L_BI 転移が負の dT/dp 値を持つことは、Clapevron の式に基づき考えると、この転移の体積変化(ΔV)が負値 となることを意味し,"両相の圧縮率差に関連している。 Lc/Lg/転移曲線とLg/LgI 転移曲線は、Lg/LgI 転移曲線の負勾 配により、高圧下(DMPC約310MPa, DPPC約115MPa) で交差し,この圧力以上では Lp/LpI 転移は準安定相間の転 移となる。加えて DMPC 二重膜では、副転移曲線が前転移 曲線と低圧下(約35 MPa)で交差し、常圧下では準安定相 であった Lβ[,]相が交差点の圧力以上で安定相へ転移する。他 方, DPPC 二重膜では全圧力範囲において副転移曲線が主 転移および前転移曲線よりも低温側に位置するため、三つ のゲル相は全て安定相として相図上に出現する。

PG は分子内中性脂質である PC と PE とは異なり,極性 基部分に負電荷を有する酸性リン脂質である。上述した PC と PE の二重膜は純水中の結果であるが, PG の場合,純水 中では極性基間の大きな反発のために単層ベシクルとなり, 相転移の協同性が著しく低下する。^{12,13})以下では,高添加 塩 (NaCl) 濃度下,極性基間相互作用を遮蔽した条件のも とで得られたジミリストイル-PG (DMPG) およびジパルミ トイル-PG (DPPG) 二重膜の膜状態について述べる。

濃度1 mol kg⁻¹の NaCl 水溶液中における DMPG および DPPG 二重膜に対して得られた DSC 測定の結果を Fig.2(i),(k)に示す。^{14,15)} PG 二重膜はアニーリング処理方法 に依存して複雑な熱的挙動を示す。短期間の低温貯蔵によ る静的なアニーリング処理を施した試料の1回目の昇温過 程では, DMPG 二重膜では前転移と主転移, DPPG 二重膜 では副転移, 前転移および主転移が出現し, 2回目の昇温 では, 両二重膜共に前転移と主転移のみが出現する。他方, 試料に凍結融解を含む長期間の動的なアニーリング処理を 施した場合, 主転移温度よりも高温側において, DMPG 二 重膜では非対称な吸熱ピーク, DPPG 二重膜では大小の連 続した吸熱ピークが出現し, 全く別な熱挙動となる。後者 の特異的な転移は二重膜会合体の形状が棒状へと変化した 安定水和結晶 (L_c2) 相から L_a相への相転移であり、¹⁰短期 間のアニーリング処理により DPPG 二重膜に対して観測さ れるのは準安定水和結晶 (L_c1) 相である。また, DPPG 二 重膜の L_c2/L_a転移における連続した吸熱ピークのうち,低 温側の小さなピークは棒状会合体の末端頭部部分からの L_a相への相転移に,高温側の大きなピークは中央胴体部分 からの相転移に対応している。¹⁴⁾DMPG 二重膜では,上記 二つの転移温度が接近し,L_c2/L_a転移は非対称な吸熱ピー クとなる。PG 二重膜では,極性基頭部の静電的相互作用に より膜状態のみならず,会合体形態の変化をも引き起こす。

Fig.2(j),(l)は静的および動的アニーリング条件により得られた PG 二重膜の T-p相図である。¹⁵⁾静的アニーリング 条件で調製した試料を加圧すると、常圧下において観測さ れた全ての相転移温度は上昇し、特に DPPG 二重膜では、 高圧力下、L₀I 相を形成する。他方、動的アニーリング条件 で完全に L₂2 相に調製した試料を加圧すると、L₂/L₀転移 温度の上昇のみが生じる。ここで、その dT/dp 値は主転移 のものよりも小さいため、DPPG 二重膜では、75 MPa 付近 で L₂/L₀転移曲線は主転移曲線と交差する。PG 二重膜が球

DM chain series

状会合体の状態においては、極性基頭部への Na⁺イオンの 結合が不完全なため頭部断面積が大きくなり, PG 二重膜の 高圧相挙動はゲル相が多形化した PC 二重膜のものに類似 する。これに対して、極性頭部の水分子が完全に脱水和し た棒状会合体では、頭部断面積が収縮し, PG 二重膜の高圧 相挙動は PE 二重膜のものと類似する。したがって, PG 二 重膜の示す複雑な相挙動は PC と PE が示す膜状態を重ね 合わせたものとして解釈できる。

Table 1 に PE, PC, PG 二重膜に対する大気圧下における 相転移熱力学量を挙げる。¹⁷⁾ 全てのリン脂質の各相転移 温度は,鎖長の増加に伴い増加する。中でも PE 二重膜の 主転移温度は同鎖長の PC および PG 二重膜よりも高く, L_c/L_a温度は同鎖長の PG 二重膜よりも高い。これは, PE 二 重膜が分子間水素結合を通して PC および PG 二重膜より 充填構造の高い膜を形成することによる。また, dT/dp 値は 各相転移に特徴な値を取る。すなわち,前転移は 0.13 – 0.15 K MPa⁻¹, 主転移は 0.21 – 0.25 K MPa⁻¹ の範囲にある。L_e相 関連転移は 0.08 – 0.22 K MPa⁻¹ と幅広いが,これは相転移 の種類と形成される L_e相の安定性の差異に起因している。 さらに,相転移熱力学量も各相転移に特徴的である。主



DP chain series

Fig.2 DSC thermograms, enthalpy diagrams and *T*-*p* phase diagrams of saturated phospholipid bilayer membranes: (a) and (b) DMPE, (c) and (d) DPPE, (e) and (f) DMPC, (g) and (h) DPPC, (i) and (j) DMPG, (k) and (l) DPPG. The results of the PG bilayer membranes were obtained in 1.0 mol kg⁻¹ aqueous NaCl solutions. Phase transitions: (\Box) L_c/L_a transition and subtransition, (Δ) pretransition and transitions between gel phases, (\bullet) main transition. Solid and dotted lines in the *T*-*p* phase diagrams indicate transitions between stable phases and those between metastable phases, respectively. Metastable phases are shown in parentheses. Solid and broken lines in figures (j) and (l) correspond to transitions for the rod-like and spherical aggregates, respectively.

Lipid	Р. Т	Т	d <i>T</i> ∕dp	ΔH	ΔS	ΔV
		(°C)	(K MPa ⁻¹)	(kJ mol ⁻¹)	(J K ⁻¹ mol ⁻¹)	(cm ³ mol ⁻¹)
DMPE	L_β/L_α	49.8	0.25	25.1	78	19.5
	$L_{c}\!/L_{\alpha}$	56.9	0.22	80.8	245	54.5
DPPE	$L_\beta\!/L_\alpha$	63.5	0.25	34.7	103	26.0
	$L_{c}\!/L_{\alpha}$	65.3	0.21	91.2	269	56.6
DMPC	$L_c\!/P_{\beta'}$	17.1	0.08	25.7	89	7.1
	$L_{\beta'}\!/P_{\beta'}$	14.9	0.13	4.5	16	2.0
	$P_{\beta'}\!/L_{\alpha}$	24.0	0.21	25.7	87	18.3
DPPC	$L_c\!/L_{\beta'}$	21.5	0.18	26.3	89	16.1
	$L_{\beta'}\!/P_{\beta'}$	34.3	0.13	4.6	15	2.0
	$P_{\beta'}\!/L_{\alpha}$	42.0	0.22	36.4	116	25.4
DMPG ^a	$L_{\beta'}\!/P_{\beta'}$	19.5	0.15	3.5	12	1.8
	$P_{\beta'}\!/L_{\alpha}$	24.7	0.23	24.0	80	18.1
	$L_c 2/L_\alpha$	42.5	0.15	69.0	219	33.4
DPPG ^a	$L_c 1/L_{\beta^\prime}$	32.0	0.14	28.2	92	12.9
	$L_{\beta'}\!/P_{\beta'}$	40.7	0.15	5.4	17	2.6
	$P_{\beta'}\!/L_{\alpha}$	42.4	0.22	35.4	112	25.1
	$L_c 2/L_{\alpha}$	48.1	0.17	96.9	302	51.3

Table 1Thermodynamic properties for the phase transitionsof saturated phospholipid bilayer membranes at 0.1 MPa

^a The values in 1.0 mol kg⁻¹ aqueous NaCl solution.

転移の熱力学量は、各々のリン脂質二重膜において鎖長依存的に増加するが、いずれにおいても鎖長が同等な場合、ほぼ同等となる。他方、前転移の熱力学量は非常に小さく、 且つ鎖長依存性も見られないことから、二重膜充填のエネルギー変化は非常に小さい。Le相関連転移に関しては、PE 二重膜のLe/Lp転移の相転移熱力学量値をLe/La転移とLp/La 転移の差から求めてみると、結果は PC 二重膜のものより も2倍程大きくなり、PE 二重膜は非常に安定な Le 相を形成することによく対応する。4 PG 二重膜では、Le2/La転移の非常に大きな相転移熱力学量値から、棒状会合体状態中のPG 分子は顕著に安定化した状態であると言える。

3. リン脂質二重膜の非二重膜構造形成

ある種のリン脂質は、自発的あるいは適当な条件下、二 重膜ではなく非二重膜構造の相状態をとる。^{11,18)}この非二 重膜構造は、脂質膜内における分子間相互作用研究に対し て格好の題材となり得る。リン脂質が形成する非二重膜は 幾つかの構造が知られているが、我々はアシル鎖の状態に 着目し、鎖が凝縮状態で二重膜を構成する二つの単分子膜の脂質炭化水素鎖が互い違いに相互貫入した L_βI 相および 鎖が融解状態で脂質分子が水を核にして円柱構造を形成し、 その円柱が二次元の六方格子状に充填した逆へキサゴナル (H_{II})相、両非二重膜の構造形成を調査してきた。ここで は、飽和ジアシル PC 二重膜の L_βI 相と不飽和ジアシル PE 二重膜の H_{II} 相の形成を熱力学的相図に基づいて述べる。

Fig.2(f),(h)から, DMPC および DPPC 二重膜は高圧力下 で L_pI 相を誘起するが, その形成は疎水鎖長依存的である ことが見て取れる。鎖長 14 から 22 までの等価な二つのア シル鎖を有する 9 種類の飽和ジアシル PC (CnPC: n = 14 – 22) 二重膜の *T*-*p* 相図を重ね合わせたものを **Fig.3(a),(b),(c)** に示す。^{19,20)} アシル鎖長の増加に伴い, CnPC 二重膜の *Tp* 相図中の相境界線が左上の高温・低圧領域へと移動し, L_pI 相の領域が低圧領域へと顕著に拡張される。*T*-*p* 相図上 において出現する 3 種類の多形ゲル相 (L_p相, P_p・相および L_pI 相) の三重点(共存点)を最小指組み構造化点と定義す ると, 圧力誘起 L_pI 相形成は, 最小指組み構造化点の温度

(MIT) および圧力 (MIP) の値により特徴づけられる。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.3(d)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大すると低い 圧力で L_βI 相が誘起される。また、C22PC 二重膜において MIP 値はほぼ 0 となる。したがって、C22PC 二重膜において ては、加圧すること無く、常圧下、水和のみで L_βI 相を形 成することを意味する。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 定の結果に基づいて、その低温ゲル相は L_βI 相であること を実証した。¹⁹ 換言すると、圧力誘起 L_βI 相形成にはアシ ル鎖長の長鎖限界が存在する。

これに対して、短いアシル鎖長では MIP は大きな値を取 り、C14PC (DMPC) 二重膜では約 300 MPa となる。我々 は以前, 圧力誘起 L_pI 相形成を MIT と MIP の値を用いて検 討し, 両者の比の値 (MIT/MIP) を鎖長に対してプロット してみると、線形の相関があることを見出した (**Fig.3(d)**挿 入図)。⁷ MIT/MIP 値の物理的意味は明確ではないが、こ の値が体積の次元になることから、L_pI 相形成の体積変化 が鎖長依存的ではないかと推察している。他方、このプロ ットを外装してみると、C13PC 二重膜において値が 0 とな る。この事実は、C13PC 二重膜では L_pI 相形成は、起こり 得ないことを示唆しており、L_pI 相形成にはアシル鎖長の 短鎖限界も存在することを明示する。これらより、CnPC 二 重膜の L_pI 相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



Fig.3 (a), (b) and (c) Superposed temperature-pressure phase diagrams of CnPC bilayer membranes: (1) C14PC, (2) C15PC, (3) C16PC, (4) C17PC, (5) C18PC, (6) C19PC, (7) C20PC, (8) C21PC, (9) C22PC. Phase transitions: (\triangle) pretransition and transitions between gel phases, (\bullet) main transition. (d) Minimum interdigitation pressure of CnPC bilayer membranes as a function of acyl chain length. The inset in figure (d) shows linear correlation between the ratio MIT/MIP and acyl chain length. Closed circles in figure (d) indicate the limitation of chain lengths for the pressure-induced interdigitation.

膜のみが圧力誘起 LβI 相を形成することが分かる。20)

分子構造の異なる4種類の不飽和ジアシルPE(鎖長16, 18 で 9 位と 10 位の間に cis 二重結合を有するジパルミト オレオイル PE (DPOPE), ジオレオイル PE (DOPE), 鎖長 18 で9 位と10 位の間に trans 二重結合を有するジエライド イル PE (DEPE), 飽和・不飽和非対称鎖を有するパルミト イルオレオイル PE (POPE)) が形成する二重膜に対する DSC 測定の結果を Fig.4(a)に挙げる。^{4,21)} これら不飽和ジア シル PE 二重膜においては、熱履歴に依存しない大きな吸 熱ピークと非常に小さな吸熱ピークが観測される。大きな 吸熱ピークは、通常は鎖融解の主(L_β/L_α)転移であるが、 溶媒の水の融点以下で観測される場合には、L。相形成が加 速されるため, 往々にして Lc/Lα転移となる。22) これに対し て,非常に小さな吸熱ピークは,Lα相から HII相への相転移 に対応している。⁴⁾ Fig.4(b),(c),(d)に,これら PE 二重膜の *T*-*p*相図を示す。^{4,21}) DPOPE と DOPE 二重膜の L_α/L_α転移お よび DEPE と POPE 二重膜の主転移の dT/dp 値は, それぞ れほぼ同値となり、これら二重膜の相転移は同種類である ことを確証する。対照的に, DPOPE および DOPE 二重膜の L_α/H_{II} 転移の dT/dp 値は約 0.39 K MPa⁻¹ と著しく大きくな るが, DEPE と POPE 二重膜では約 0.25 K MPa⁻¹となる。 こつの cis 不飽和結合を有する PE 二重膜の Lα/HII 転移は高 い圧力感受性を有している。我々はこれまで、二重膜相転 移の dT/dp 値は相転移種類に応じてほぼ類似した値をとる ことを見出してきたが、この傾向は Lα/HII 転移に対しては 当てはまらず、La/HII 転移の dT/dp 値は疎水鎖構造の影響を 顕著に受ける。

不飽和ジアシル PE 二重膜の相転移熱力学量を Table 2 に 挙げる。^{4,21)} 不飽和ジアシル PE 二重膜に特徴的な L_a/H_{II} 転移の熱力学量は極めて小さい。L_a/H_{II} 転移は二重膜ラメ ラ構造から非二重膜逆へキサゴナル構造へと大きな充填構 造変化が起こるが、相転移前後で二重膜中の PE 分子の疎 水鎖は融解状態のままであり、両相間の熱力学状態の差異 は鎖融解を含む相転移に比べてかなり小さい。ここで、二 重膜/非二重膜転移である L_a/H_{II} 転移への熱的および体積 的寄与を二重膜/二重膜 (L_a/L_aあるいは L_b/L_a) 転移のも のと比較してみると (Table 3)、L_a/H_{II} 転移では、熱的寄与 よりも体積的寄与が大きく、特に DOPE では2倍以上大き い。大きな体積寄与は Clapeyron の式を通して dT/dp 値に 反映されることから、概して L_a/H_{II} 転移は体積駆動の転移 であると言える。

4. リン脂質二重膜内充填構造のイメージング

リン脂質二重膜における膜内微視的環境は,膜中に包含 された蛍光プローブ分子の挙動から評価できる。この蛍光

Table 2 Thermodynamic properties for the phase transitions ofunsaturated diacyl-PE bilayer membranes at 0.1 MPa

T to tal	Р. Т	Т	dT/dp	ΔH	ΔS	ΔV
Lipid		(°C)	(K MPa ⁻¹)	(kJ mol ⁻¹)	(J K ⁻¹ mol ⁻¹)	(cm ³ mol ⁻¹)
DPOPE	$L_{c}\!/L_{\alpha}$	-	0.16	-	-	-
	$L_{\alpha}\!/H_{II}$	42.3	0.38	0.7	2	0.8
DOPE	$L_{c}\!/L_{\alpha}$	-5.5	0.15	28.0	105	15.3
	$L_{\alpha}\!/H_{II}$	14.5	0.39	1.4	5	1.9
DEPE	$L_\beta\!/L_\alpha$	38.0	0.21	33.0	106	22.2
	$L_{\alpha}\!/H_{II}$	64.7	0.25	2.1	6	1.6
POPE	$L_\beta\!/L_\alpha$	25.0	0.22	26.0	87	19.0
	$L_{\alpha}\!/H_{II}$	68.1	0.24	1.9	6	1.4

Table 3 Ratios of ΔH and ΔV between bilayer-nonbilayer and bilayer-bilayer transitions for unsaturated PE bilayer membranes

Lipid	Ratio of ΔH	Pct.	Ratio of ΔV	Pct.
DOPE	$\Delta H(L_{\alpha}/H_{\rm II})/\Delta H(L_{\rm c}/L_{\alpha})$	5.0	$\Delta V(L_{\alpha}/H_{\rm II})/\Delta V(L_{\rm c}/L_{\alpha})$	12.4
DEPE	$\Delta H({\rm L}_{\alpha}/{\rm H}_{\rm II})/\Delta H({\rm L}_{\beta}/{\rm L}_{\alpha})$	6.4	$\Delta V(L_{\alpha}/H_{\rm II})/\Delta V(L_{\beta}/L_{\alpha})$	7.2
POPE	$\Delta H(L_{\alpha}/H_{\rm II})/\Delta H(L_{\beta}/L_{\alpha})$	7.3	$\Delta V(L_{\alpha}/H_{\rm II})/\Delta V(L_{\beta}/L_{\alpha})$	7.4

プローブ法においては、膜中の疎水性環境調査には疎水性 プローブ、親水性環境調査には親水性プローブが使い分け られているが、両プローブは測定波長領域やプローブの配 向位置も異なることから膜内パッキングに対して統一的な 理解を得ることは一概に難しい。我々は、数ある蛍光プロ ーブの中から、両親媒性プローブの一種である Prodan (6propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene)のリン脂質二重膜 内における配向挙動は脂質分子間の充填構造と非常に良い 相関があり、脂質二重膜が示すほとんどの相転移に鋭敏に 応答することを見出した。この Prodan を用いることにより 一つの蛍光プローブでリン脂質二重膜内の充填構造(換言 すると、膜内における脂質分子間の相互作用様式)の評価 が可能となる。²³⁻²⁵⁾最後に、Prodan を用いたリン脂質二重 膜の蛍光イメージングを紹介する。

Fig.5に Prodan 含有 C17PC 二重膜の蛍光スペクトル測定 の結果を示す。²⁶⁾ ここで、蛍光実験は平均粒径約 170 nm の 大きな多層ベシクル(LMV)に対して、T-p 相図上に記載 した矢印の昇温過程(Fig.5(a))に沿って行った。Prodan 分 子が PC 二重膜中に分配するとその蛍光スペクトルの極大 波長(λ_{max})の値は相状態に依存し、 λ_{max} 値は相転移に伴 い急激に変化する(Fig.5(b))。 λ_{max} は定温、定圧下において プローブ分子周囲における溶媒の誘電率に依存し、波長の 変化は脂質二重膜中における脂質分子の局所誘電率に関連



Fig.4 (a) DSC thermograms of unsaturated PE bilayer membranes: (1) DPOPE, (2) DOPE, (3) DEPE, (4) POPE. Here the part of an ice-melting peak in the thermogram 2 is deleted. *T*–*p* phase diagrams of unsaturated PE bilayer membranes: (b) DPOPE, (c) DOPE, (d) (1) DEPE, (2) POPE. Phase transitions: (\Box) L_c/L_a transition, (\odot) main transition, (∇) L_a/H_{II} transition.

Netsu Sokutei 47 (2) 2020



Fig.5 (a) T-p phase diagram of C17PC bilayer membrane: $(\bigcirc, \bigtriangleup)$ LMV, $(\bullet, \blacktriangle)$ GMV. Dotted arrows indicate the process of temperature elevation: (1) LMV, (2) GMV. (b) Fluorescence spectra of Prodan for LMV of C17PC bilayer membrane at 105.6 MPa as a function of temperature. Here the spectrum is depicted every 1°C from 20.0°C to 84.5°C. (c) Second-derivative spectra of figure (b). Wavelengths at the minimum, characteristic of each phase, are shown in figure (c).

づけられる。²⁷⁾ 高λ_{max}値はプローブが親水(極性)環境に 置かれていることを示し、一方、低λmax 値はプローブが疎 水(低極性)環境にあることを示す。飽和ジアシル PC 二重 膜がゲル(L_βあるいは P_β)相,L_α相,L_βI相を形成すると き, λmax 値はそれぞれ約 430, 480, 500 nm となる。詳細は 文献²⁵⁾を参照していただきたいが,430 nm のピークは Prodan 分子がグリセロール骨格付近の低極性領域に,480 nm のピークはリン酸基近傍領域に、そして 500 nm のピー クは親水基付近の親水領域に存在することを意味する。こ の事実は、PC 二重膜中における Prodan 分子の配向位置は 膜内脂質分子の充填状態と密接に関連することを示してい る。スペクトルのλmax 値から二重膜中の Prodan 分子の配向 位置を見積もることはある程度可能であるが、スペクトル が対称ピークであることは少なく、多くの場合、スペクト ルにショルダーが見られ, Prodan 分子は二重膜内の単一箇 所には存在していないことを示唆する。この問題に対処す るため、我々は蛍光スペクトルの二次微分スペクトルを用 いて配向位置解析を行っている。25) Fig.5(b)の元スペクト ルを波長に関して二次微分した結果を Fig.5(c)に示す。 C17PC 二重膜の二次微分曲線には 430, 433, 481 および 498 nmに極小波長が存在するのが分かる。すなわち、C17PC二 重膜中の一連の Prodan の蛍光スペクトルは少なくとも4 種類の成分で構成されており、それぞれ L_β, P_β, L_αおよび L_βI相に特徴的な蛍光極大波長であることが理解できる。

Fig.5(c)の二次微分スペクトルを三次元プロットするこ とにより、リン脂質二重膜の充填構造に関するイメージマ ップを構築することができる。25,26) C17PC 二重膜 (LMV) に対して構築した三次元イメージマップを Fig.6(a)に示す。 ここで, 蛍光強度は低強度(青色)から高強度(赤色)に向 かって色分けして描いてある。二次微分スペクトルの三次 元蛍光スペクトル図における極小値の変化が明瞭に見て取 れる。約43 ℃ で440 nm から 500 nm に、約68 ℃ で 500 nm から440 nm に、そして約75 °C で440 nm から480 nm には っきりと変化する。続いて,二重膜内における脂質充填構造 の差違を示すために、ベシクルサイズの効果を取り上げ る。26) 上記と同様な蛍光実験を平均粒径約 5000 nm の巨大 多層ベシクル (GMV) に対して実施した。Fig.5(a)から分か るように、C17PC 二重膜の相転移温度および圧力にはサイ ズの違いはほとんど現れない。Fig.6(b)は GMV に対して構 築した三次元イメージマップである。GMV では 500 - 525 nmの間に緑の谷部が出現し、Lβ相であるのにも関わらず、 Prodan 分子の一部が最親水領域に分配しているのが分かる。 GMV 二重膜中の PC 分子は LMV よりも高密度に固く充填 するために、Prodan 分子の一部はグリセロール骨格付近か ら最親水領域に絞り出される。また、GMV における図中の 谷部はLMV と比較していずれの相においても深くなる。



Fig.6 (a) 3-D imaging of C17PC bilayer membrane: (a) LMV at 105.6 MPa in the temperature range 20.0 - 84.5 °C, (b) GMV at 119.9 MPa in the temperature range 20.0 - 87.7 °C.

これは GMV 中の蛍光強度増加によるもので, 膜中の脂質 と Prodan のモル比がほぼ変わらないことを考慮すると, 高 密度充填により GMV の単位表面積あたりの Prodan の分布 密度が LMV よりも上昇したためであろう。このように, 二次微分スペクトルの三次元イメージマップは Prodan 分 子の配向位置と二重膜相状態の相関を表現でき,マップ中 のスポット領域の深さや広さを解析することにより,二重 膜内充填構造の視覚的定量化が可能となる。これまでに 種々のジアシル PC 二重膜の *T-p* 相図に基づき,ベシクル サイズ効果の他に,疎水鎖長,²⁵) 疎水鎖非対称性 ^{28,29})の効 果および L_c 相形成に伴う分子充填変化 ³⁰⁾ なども解明して いるので,文献を参照されたい。

5. おわりに

これまで,リン脂質分子の化学構造を系統的に変化させ, 温度と圧力という熱力学変数による二重膜構造変化の検出 によって数多くの T-p 相図を作成し、分子構造・温度・圧 カー集合体構造相関を明らかにしてきた。例えば、極性頭 部構造の異なるリン脂質の二重膜に対する T-p 相図から, 飽和 PE 二重膜では、極性頭部間の強い(引力的)相互作用 のため水和結晶相状態が支配的となり、ゲル相は主に準安 定相として存在すること、飽和 PC 二重膜では、大きな極 性頭部に起因してゲル相に多形が出現すること, 飽和 PG 二重膜では、荷電極性頭部の弱い(斥力的)相互作用によ り、二重膜会合体の形態変化が引き起こること、と言った 頭部構造の差異が二重膜形成に顕著な効果をおよぼすこと が理解できる。また、非二重膜構造形成に対する T-p 相図 は、構造形成の特異的な相挙動とその形成を支配する駆動 力を明示する。さらに、T-p相図に沿った脂質二重膜の蛍 光イメージングは, 脂質膜内における分子間相互作用の視 覚的な理解を可能とする。本稿では、主に我々が過去より 行ってきた T-p 相図を基盤にしたリン脂質単独系における 二重膜研究について述べてきた。他方,リン脂質二重膜は 溶媒種類や他成分添加によっても顕著に影響を受ける。紙 面の関係上、これらの効果については述べることはできな かったが、関連する文献を付記しておく。31-33)

生体膜の基盤であるリン脂質二重膜は、脂質分子が疎水 性相互作用を駆動力にして自己組織化した分子集合体であ り、置かれた環境に対応して多様に膜状態を変化させる。 この点で、共有結合で構成分子が結合した生体高分子であ る核酸、タンパク質および糖質とは全く異なる。今後、役 割が不明である数多くの脂質に対し、さらに系統的な熱お よび高圧力研究を行い、*T-p* 相図を蓄積することで、各脂 質の役割や存在意義を明確にしたいと考えている。

謝 辞

2019年度の熱測定学会賞受賞の栄誉を賜り, 齋藤前会長, 古賀会長をはじめとして, 選考委員の先生方に心より御礼 申し上げます。これまで, 直接に研究のご指導いただきま した恩師の先生方(研究者としての礎を築いていただいた 九州大学(故)本村欣士 名誉教授および荒殿 誠 教授, 研 究者としての心構えや実験手法をご教授いただいた徳島大 学 金品昌志 名誉教授, 生体分子の俯瞰的な考え方をご教 授いただいた米国ユタ大学(故)上田一作 教授)に謝意を 表します。熱と圧力を基軸に据えた本研究は, 徳島大学に おいて一貫して進めてきたものです。過去より今日まで脂 質膜研究に携わってくれた研究室内教員, 数多くの学部卒 業生および大学院修了生に感謝します。

文 献

- W. Stillwell, An Introduction to Biological Membranes, 60-71 (2013) Academic Press, San Diego.
- 2) L. K. Buehler, *Cell Membranes*, 122-130 (2016) Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, New York.
- 3) M. Kusube, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Biochim. Biophys.* Acta 1668, 25-32 (2005).
- H. Matsuki, S. Endo, R. Sueyoshi, M. Goto, N. Tamai, and S. Kaneshina, *Biochim. Biophys. Acta* 1859, 1222-1232 (2017).
- M. Kodama, H. Inoue, and Y. Tsuchida, *Thermochim. Acta* 266, 373-384 (1995).
- 6) H. Ichimori, T. Hata, T. Yoshioka, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Chem. Phys. Lipids* 89, 97-105 (1997).

- 7) H. Ichimori, T. Hata, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Biochim. Biophys. Acta* 1414, 165-174 (1998).
- R. N. A. H. Lewis, N. Mak, and R. N. McElhaney, Biochemistry 26, 6118-6126 (1987).
- R. N. A. H. Lewis and R. N. McElhaney, *Biochemistry* 29, 7946-7953 (1990).
- L. F. Braganza and D. L. Worcester, *Biochemistry* 25, 2591-2596 (1986).
- J. L. Slater and C.-H. Huang, Prog. Lipid Res. 27, 325-359 (1988).
- 12) M. Kodama, T. Miyata, and T. Yokoyama, *Biochim. Biophys. Acta* **1168**, 243-268 (1993).
- M. Kodama, H. Aoki, and T. Miyata, *Biophys. Chem.* 79, 205-217 (1999).
- 14) S. Tanaka, N. Tamai, M. Goto, S. Kaneshina, and H. Matsuki, *Chem. Lett.* **41**, 304-306 (2012).
- M. Goto, H. Okamoto, N. Tamai, K. Fukada, and H. Matsuki, *High Pressure Res.* 39, 238-247 (2019).
- 16) Y.-P. Zhang, R. N. A. H. Lewis, and R. N. McElhaney, *Biophys. J.* 72, 779-793 (1997).
- 17) H. Matsuki, M. Goto, and N. Tamai, *Chem. Pharm. Bull.* 67, 300-307 (2019).
- 18) S. M. Gruner, *The Structure of Biological Membranes*, 2nd ed., ed. by P. L. Yeagle. 173–199 (2005), CRC Press, New York.
- 19) M. Goto, A. Wilk, A. Kazama, S. Chodankar, J. Kohlbrecher, and H. Matsuki, *Colloids Surf. B: Biointerf.* 84, 44-48 (2011).
- 20) M. Goto, T. Endo, T. Yano, N. Tamai, J. Kohlbrecher, and H. Matsuki, *Colloids Surf. B: Biointerf.* **128**, 389-397 (2015).
- R. Sueyoshi, K. Tada, M. Goto, N. Tamai, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Colloids Surf. B: Biointerf.* 50, 85-88 (2006).
- 22) M. Kusube, M. Goto, N. Tamai, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Chem. Phys. Lipids* **142**, 94-102 (2006).
- M. Kusube, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Colloids Surf. B: Biointerf.* 42, 79-88 (2005).
- 24) M. Kusube, N. Tamai, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Biophys. Chem.* **117**, 199-206 (2005).
- 25) H. Matsuki, M. Goto, M. Kusube, and N. Tamai, Bull. Chem. Soc. Jpn. 84, 1329-1335 (2011).
- 26) M. Goto, H. Sawaguchi, N. Tamai, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Langmuir* 26, 13377-13384 (2010).
- 27) E. Okamura and M. Nakahara, *Liquid Interfaces in Chemical, Biological, and Pharmaceutical Applications*, ed. by A. G. Volkov, 775-805 (2000), Marcel Dekker, New York.
- 28) M. Goto, M. Kusube, N. Tamai, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 1067-1078 (2008).
- 29) M. Goto, S. Ishida, N. Tamai, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Chem. Phys. Lipids* 161, 65-76, (2009).
- 30) M. Goto, A. Wilk, K. Kataoka, S. Chodankar, N. Tamai, M. Fukui, J. Kohlbrecher, H. Ito, and H. Matsuki, *Langmuir* 28, 12191-12198 (2012).
- H. Matsuki, H. Okuno, F. Sakano, M. Kusube, and S. Kaneshina, *Biochim. Biophys. Acta* 1712, 92-100 (2005).
- 32) N. Tamai, T. Izumikawa, S. Fukui, M. Uemura, M. Goto, H. Matsuki, and S. Knaeshina, *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 2513-2523 (2013).
- 33) H. Matsuki, K. Kato, H. Okamoto, S. Yoshida, M. Goto, N. Tamai, and S. Kaneshina, *Chem. Phys. Lipids* 209, 9-18 (2017).



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