

Na⁺共存下で形成される酸性リン脂質, ホスファチジルグリセロールの棒状ベシクル

宮田貴裕, 児玉美智子

(平成5年5月6日受理)

Crystalline Superstructures in Negatively Charged Phospholipid Plus Na Cation

Takahiro Miyata and Michiko Kodama

(Received May 6, 1993)

On annealing at 5°C of a gel phase temperature, multilamellar vesicles of dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) prepared in the presence of 1 M NaCl at pH 7.0 converted to well-developed crystalline cylindrical structures similar to those formed by Ca²⁺-bound DMPG. The new crystalline phase transformed into the liquid crystal phase at 44.2°C. The transition enthalpy (~19 kcal/mol) is about 2.5 times larger than that of the MLV gel to liquid crystal phases, suggesting a large contribution of pseudo lattice enthalpy to the chain-melting transition of Na⁺-bound DMPG in the present system. The conversion process of the MLV gel to cylindrical crystalline phases with an increase in annealing time was investigated by electron microscopy and it was found that a set of membranes (8-9 lamellae) separated from the MLV surface grows into helical superstructures and, subsequently, into the final cylindrical structures.

1. 緒言

リン脂質は、生体膜全重量の約60%以上を占める膜構成主成分であり、生体系の典型的な両親媒性分子でもある。従って、水の共存下において特異的な分子集合体を形成する。今日、これに関して特に注目されている現象は、一般にベシクル(リポソーム)と呼ばれる二分子膜閉鎖性小胞体の形成である。

リン脂質は、リン酸基を含む親水頭部の相違に基づいて、中性と酸性リン脂質の二種に大別される。中でも、酸性リン脂質であるphosphatidylglycerol(PG)(Fig.1参照)は葉緑体膜およびバクテリア膜に存在する主要なリン脂

質である。Fig.1に示すように、pH~3(pKa=2.9)以上においてはPGリン酸基のプロトンが解離するので、この分子は負の荷電を有する。このような観点から、今日、生体膜機能発現に対するPG負電荷の役割が注目され、PGリン酸基のイオン化の程度を変えることによってこのリン脂質分子の集合状態が如何に変化するかが検討されている。それらの結果をTable 1に一括して示す。pH~3以下では、これよりも高いpHとは異なりPG分子はゲル相において二分子膜面に対して垂直な配列状態を選択する^{1),2)}。また、ポリマー性の陽イオンが共存すると、このリン脂質の炭化水素鎖は組み合わせ型(interdigitated form)の充填状態をとる³⁾⁻⁵⁾。さらに、その脂質頭部にCa²⁺あるいはMg²⁺のような2価陽イオンが結合すると円筒状あるいはシート状の結晶構造を形成する⁶⁾⁻¹¹⁾。一方、Na⁺等の1価陽イオンが共存すると前駆転移(T_p)と主転移(T_m)によって特性される多重膜構造を形成する^{2),5),9)}。こ

岡山理科大学理学部生物化学科: 〒700 岡山市理大町1-1
Department of Biochemistry, Okayama University of
Science, 1-1 Ridai-cho, Okayama 700, Japan

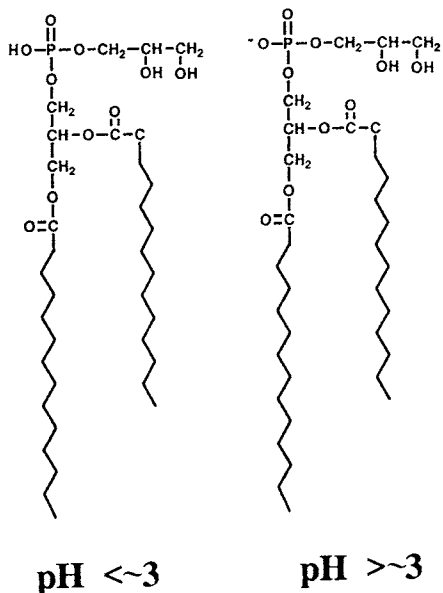


Fig.1 Protonated (pH<~3) and unprotonated (pH>~3) states of DMPG.

れに関しては、塩無添加のPGは水中に連続的に膨潤して多重膜構造を形成できないのに対して、Na⁺が多量に共存するとこの脂質の二分子膜負電荷が遮蔽されるために、多重膜構造の形成を可能にすると考えられている¹²⁾。

しかしながら、最近、我々は1MのNaCl共存下で調製した多重膜ベシクル(multilamellar vesicle; MLV)をゲル相温度で熱処理すると、結晶状の円筒構造に移行することを見いだした。この現象は、ゲル相温度においてNa⁺が2価陽イオンと同様の遮蔽効果を有することを示唆する。

本論文においては、我々によって発見された超分子集合体の形成過程および構造特性を高感度示差走査熱量測定とネガティブ染色電子顕微鏡観察によって検討したのでその結果を報告する。

2. 実験

2.1 試料

リン脂質、L- α -dimyristoylphosphatidylglycerol(DMPG, sodium salt)はSigma Chemical Co.から購入した。Silica gel plate (E. Merck)による薄層クロマトグラフィー(展開溶媒;CHCl₃:MeOH:NH₃=230:90:15)によってこの脂質の純度を検定したが、単一スポットが得られたので精製を行わないでそのまま用いた。リン脂質濃度は、酸化分解後にリン酸として定量するBartlettの改良法を用いて決定した。

Table 1 Representation of DMPG packings in the presence of different cations.

protonated state (uncharged state) pH < ~3		multilamellar structure or liposomal structure
large cation polymeric cation amphiphilic cation tris cation		
small divalent cation Ca ²⁺ ; Mg ²⁺ [Ca ²⁺]/[PG] > 0.5		cylindrical structure
small monovalent cation Na ⁺ ; Li ⁺ ; Ka ⁺		multilamellar structure or liposomal structure

2.2 ベシクルの調製

リン脂質 (DMPG) を溶解したクロロホルム溶液からロータリーエバポレーターを用いて溶媒を除去し、DMPGの薄膜を作製した。さらに、高真空下(10⁻⁴Pa)でクロロホルムを完全に除去し、得られた薄膜に 1M の NaCl を含む 10mM リン酸緩衝液 (pH=7.0) を加え、主転移以上の温度 (~ 50℃) で膨潤、振とうすることによって MLV の懸濁液を調製した。

2.3 高感度示差走査熱量測定

示差走査熱量測定は Microcal 社 (U.S.A.) 製 MC-2 型高感度示差走査熱量計を用いて行った。この装置のデータの取り込み、解析および熱量計の制御は、A/D-converter (Data Translation DT-2801) 内蔵の IBM-PS2 computer の制御下で行った。また、昇温速度は 45℃/h で行い、脂質濃度は熱量計のセル体積約 1.2ml に対し 1~2mM を用いた。

2.4 電子顕微鏡観察

電子顕微鏡観察は、日本電子社製透過型電子顕微鏡 JEM-2000EX (加速電圧 200kV) を用い、ネガティブ染色法によって行った。染色剤としてリンタングステン酸 (pH=7.4) および酢酸ウラニルの 2% (W/V) 水溶液を用いた。銅製メッシュにコロジオン支持膜を張り、さらにカーボン蒸着をしたものをグリッドとして用いた。このグリッド上にベシクル試料一滴を滴下し、これに染色剤を加えて余分の溶液を排水した後乾燥させて標本を作製した。

3. 結果・考察

上述の手順 (2.2) に従って調製した DMPG 懸濁液 (1M NaCl, pH=7.0) の電子顕微鏡写真を Fig.2A に示すが、明瞭な膜間隙 (二分子膜間の空間) を有する多重膜ベシクル構造が観察される。この MLV の熱的挙動を Fig.3a に示すが、温度 19.2℃ での小さな T_p (前駆) 転移と、24.6℃ での先鋭な T_m (主) 転移が観察される。このような MLV の出現は、1M 濃度の NaCl が共存しても PG 脂質の負電荷を中和するには十分でないことを示唆する^{2),5),13)}。そこで、この MLV 懸濁液を約 5℃ のゲル相温度で熱処理すると、24 時間後には Fig.3d に示すような転移温度 44.2℃ の新しいピークが出現し、MLV 特有の T_p と T_m 転移ピークはもはや観察されない。前駆転移が消失することから、PG 脂質の炭化水素鎖が膜面に垂直に配列していると考えられる⁹⁾。すなわち、ゲル相温度での熱処理によって Na⁺ が脂質頭部の負電荷を十分に中和する状況に至ることが示唆される。

Fig.3d の測定の後に試料を冷却し再度昇温測定を行うと、44.2℃ のピークはもはや観察されず、代わって Fig.3a と同様の T_p と T_m 転移ピークが出現する。この挙動

から、液晶相温度においては、脂質負電荷に結合した Na⁺ が解離し、その結果、熱処理前と同様の結合状態に移行することが示唆される¹¹⁾。ゲル相温度の熱処理によって新たに得られた 44℃ の転移ピークによって特性される PG 分子集合体の電子顕微鏡写真を Fig.2B に示す。この写真からは、円筒状の結晶構造 (長さ、0.7~1.5μm; 幅、150~200nm) が観察される。この結晶性超構造体の拡大写真を Fig.2C および D に示すが、8~10 層の多重膜が円筒状構造を形成しているのが明瞭に示される。また、拡大写真 Fig.2D からは、水溶液で満たされた内部空間を有する棒状ベシクル構造も観察される。Table 2 は、Fig.3 から得られる熱力学的データを集約する。この表からは、熱処理によって得られた円筒状の結晶相から液晶相への転移エンタルピーは極めて大きく、その値は、MLV の L_p ゲル相から液晶相への総転移エンタルピーの約 2.5 倍に相当する。Table 2 に示す転移エンタルピーおよび転移温度を基にして作製した MLV と円筒状結晶構造間の相対的エンタルピー (H) 関係を Fig.4 に模式的に示す。この図からは、準安定状態の MLV ゲル相に対して円筒状の結晶相が安定状態で存在することが示される。従って、この準安定 MLV ゲル相が熱処理によって、安定結晶相に移行したと考えられる。また、これら準安定-安定相間のエンタルピー差がかなり大きいことが見積もられ、その値は脂質 1mol 当たり約 11kcal に相当する。そこで、準安定ゲル相から安定結晶相への移行に伴われるエンタルピー変化量 (安定化エンタルピー) を高感度恒温型微量熱量計¹¹⁾ (TAM, Thermometric AB, Sweden) を用いて直接測定した。測定温度 5℃ (熱処理温度が 5℃ に相当) においてこの安定化エンタルピーは 10.6 kcal/mol となり、この値は Fig.4 から見積もられた安定化エンタルピーに極めて近い。従って、円筒状結晶相はエンタルピー的にかなり低い状態にあることが示唆される。Fig.3b および c は、熱処理に基づく MLV ゲル相から円筒状結晶相への移行中途過程において測定される典型的な DSC 曲線を示す。Fig.3b (熱処理時間: ~9h) においては、Fig.3d に示す 44℃ 付近の円筒状結晶相から液晶相へのピークに加えて、 T_m 転移ピーク (~24℃) よりもわずかに高温領域の 26℃ に新しいピークが観察される。また、Fig.3c (熱処理時間: ~16h) では、26℃ および 44℃ の転移ピークが観察される。従って、 T_m 転移ピークが 26℃ 付近の新しいピークに移行し、さらにひき続いてこの新しいピークが 44℃ のピークに段階的に移行すると考えられる。この現象は、MLV ゲル相が 26℃ のピークによって特性される中間状態を経て最安定状態の結晶相に至ることを示す。

*1) この結果については、次の論文で詳しく述べる。

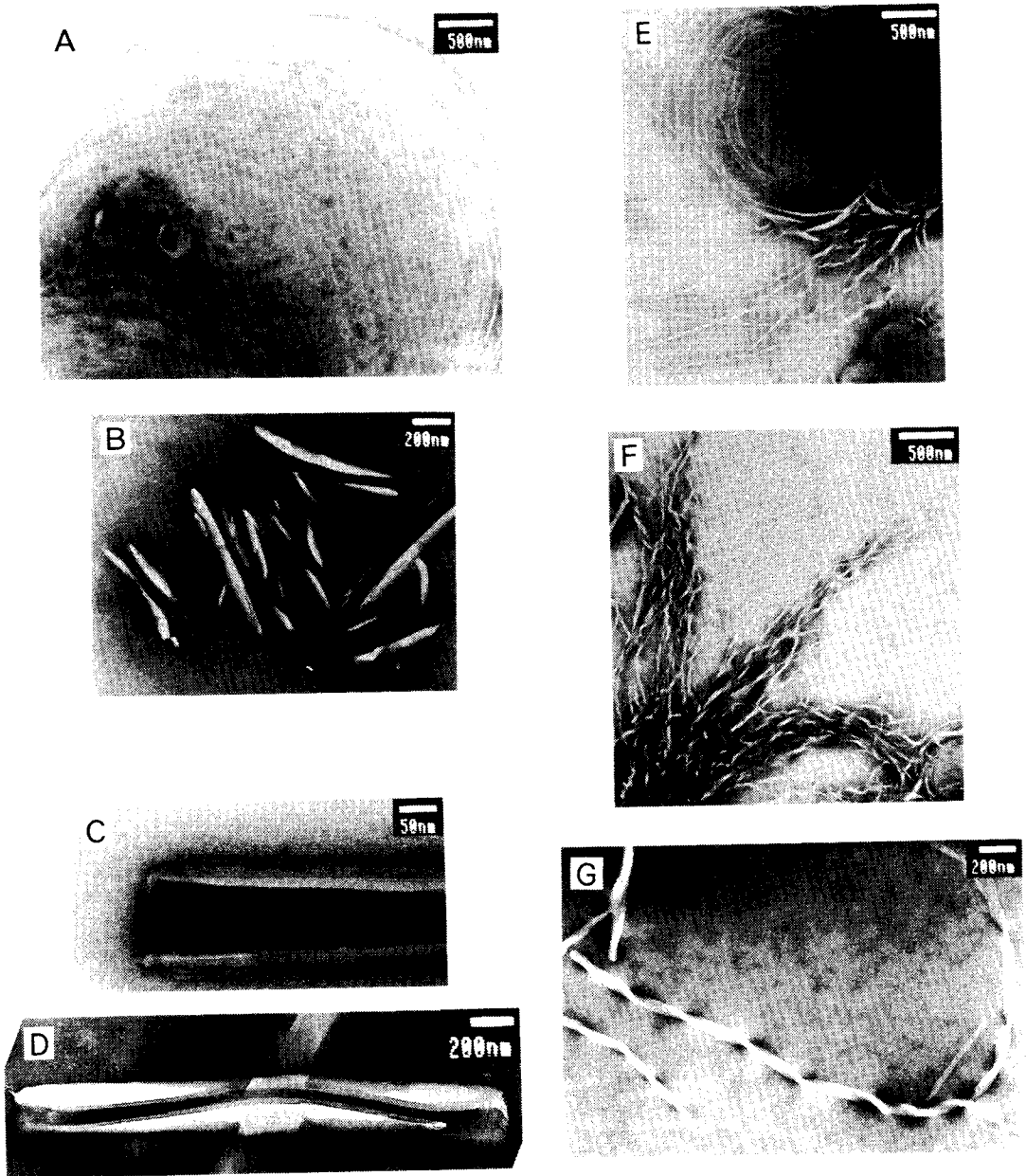


Fig.2 Negative stain electron micrographs of DMPG in the presence of 1M NaCl at pH 7.0. MLV (A) grows finally into cylindrical structures (B) by way of helical structures such as shown in E ~ G with increase in time length of annealing at 5°C. Enlarged micrographs of cylindrical and rod-like vesicular structures are shown in C and D, respectively.

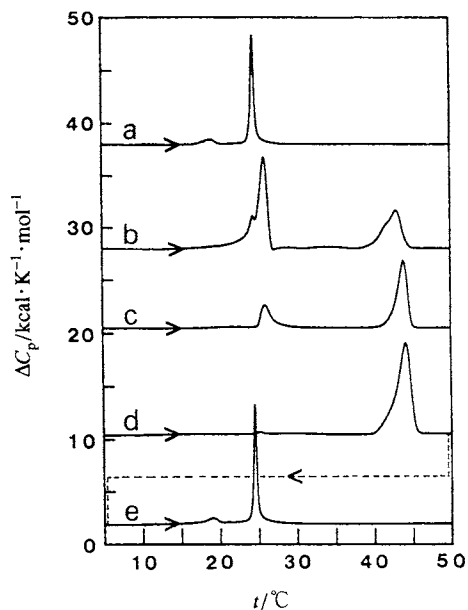


Fig.3 Apparent, excess heat capacity (ΔC_p) vs. temperature (t) curves of DMPG in the presence of 1M NaCl after annealing at 5°C for 0 (a), 9 (b), 16 (c) and 24 hours (d), respectively. Curve e represents a repeated heating scan after a heating scan shown in curve d.

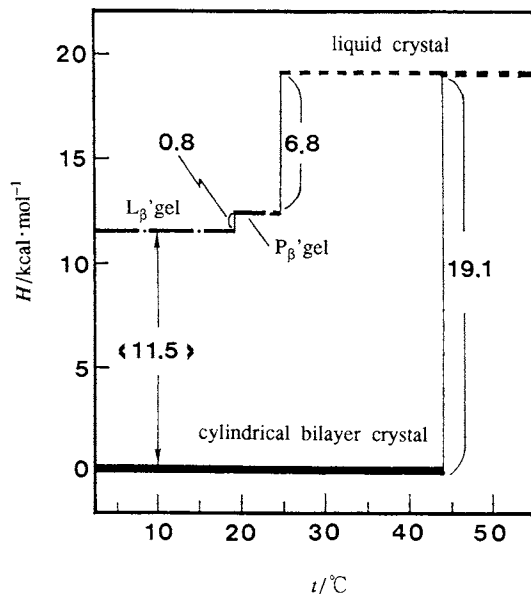


Fig.4 Schematic diagram of enthalpy (H) vs. temperature (t) curves for L β' and P β' gel phases of MLV (broken lines), cylindrical crystalline phase (solid lines) and liquid crystal phase (dotted lines). Enthalpy curve of the most stable crystalline phase is given by zero line. Numerical values in the diagram are transition enthalpies (kcal/mol) in Table II and a value given by < > is an estimated stabilization enthalpy.

Table 2 Transition temperatures (t_p , t_m and t_c), transition enthalpies (ΔH) and entropies (ΔS), and maximum values of excess heat capacity function ($\Delta C_{p,max}$) associated with phase transitions of cylindrical crystalline \rightarrow liquid crystal phases (T_c), L β' gel \rightarrow P β' gel phases (T_p), and P β' gel \rightarrow liquid crystal phases (T_m).

type of phase transition	transition temperature (t_p , t_m , t_c)/°C	ΔH kcal·mol ⁻¹	ΔS cal·K ⁻¹ ·mol ⁻¹	$\Delta C_{p,max}$ kcal·K ⁻¹ ·mol ⁻¹
T_p (L β' gel \rightarrow P β' gel)	19.2	0.8	2.7	0.5
T_m (P β' gel \rightarrow liq. cry.)	24.6	6.8	22.8	10.5
T_c (cylindrical cry. \rightarrow liq. cry.)	44.2	19.1	60.2	8.6

そこで、電子顕微鏡観察によってMLVゲル相から結晶相への移行過程を検討した。温度約5°Cで5時間熱処理を行うと、Fig.2Eの電子顕微鏡写真に示すようにMLV表面から外に向けて伸びる少数のフィラメントが観察される。熱処理10時間ではそのフィラメントはMLVを取り囲む主成分として観察される(Fig.2F参照)。すなわち、これらの電子顕微鏡写真から、MLVを構成する二分子膜多重層が外部から順に遊離することが明らかにされる。この膜遊離現象は、上述したように熱処理によってNa⁺の脂質負電荷への結合が強まるために脂質二分子膜に構造上の歪み(平板状表面への移行)が生じることが関係すると考えられる。さらに、熱処理時間を増大すると、フィラメントはFig.2Gに示すようなヘリックス構造体に成長し、最終的にはFig.2B~Dに示す円筒状あるいは棒状のベシクル構造に移行する。Fig.2E~Gの全てのヘリックス構造において観察される約30nmの単位長を考慮すると、この系でのヘリックスフィラメントの成長過程は中島と国武¹⁴⁾によって提案されたキラルな二分子膜のヘリックス超構造体への成長機構に従うと考えられる。

我々^{15),16)}や他の研究者ら^{17),18)}によって明らかにされたように、脂質や界面活性剤のような両親媒性物質と水とから構成された二成分系の相転移現象の型式は、ゲル相が熱力学的に安定かあるいは準安定状態にあるかに依存してFig.5(a)および(b)に示す2種類に分類される。1つの型式(Fig.5(a)参照)はphosphatidylethanolamine(PE)–水系¹⁸⁾に代表され、その相転移においては準安定ゲル相に対して結晶相が安定状態として存在する。Fig.4から明らかな

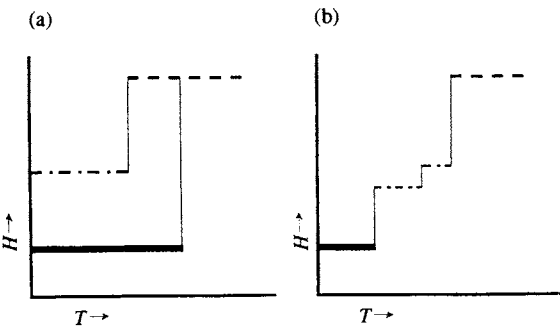


Fig.5 Schematic diagrams of H vs. t curves explaining representative two modes of phase transitions in phospholipid-water systems. Diagram (a) is characterized by a metastable gel phase and diagram (b) by stable gel phases. Crystalline phase, gel phase and liquid crystal phase are distinguished by solid, broken and dotted lines, respectively.

ように本研究の系はこの相転移様式に従う。これに対してNaCl無添加のDPPG(ammonium salt)–水系¹⁹⁾においては、phosphatidylcholine–水系^{17),20)}に代表されるもう1つの転移様式(Fig.5(b)参照)に従うことが報告されている。その転移ではゲル相が安定状態で存在し、結晶相からこの安定ゲル相へのサブ転移が低温領域に出現するが、この結果は我々によって明らかにされたNaCl共存下でのPG–水系の転移様式と相反する。従って、PG–水系の転移様式はNa⁺濃度に依存することが示され、これに対応してこの系のゲル相の熱力学的安定性もNa⁺濃度に依存することが示唆される。

本研究においては、Na⁺によって負電荷が中和されたDMPG(Na⁺結合のDMPG)はCa²⁺結合のDMPGと同様に円筒状結晶構造を形成することを明らかにした。そこで、Na⁺結合およびCa²⁺結合のDMPGの円筒状結晶相から液晶相への相転移に伴われる熱データを比較すると、転移温度はCa²⁺結合のDMPGの方がかなり高い(~89°C)⁸⁾にもかかわらず、転移エンタルピーはNa⁺結合のDMPGの方が約4kcal/molほど大きい。Na⁺結合とCa²⁺結合のDMPGによって形成される円筒状結晶相は、エンタルピー的に同程度の低い状態にあると推測される。従って、Na⁺結合およびCa²⁺結合のDMPG間でのこの転移エンタルピーの相違は、両液晶相間のエンタルピーが異なることが関係すると考えられる。すなわち、Na⁺結合のDMPGの液晶相のエンタルピーはCa²⁺結合のDMPGの液晶相のエンタルピーよりもより高い状態にあることが示唆される。液晶相でのこのエンタルピーの相違に着目するならば、相転移以上の温度においてNa⁺はCa²⁺よりも著しくPGから解離するために¹¹⁾、脂質分子間に静電的反発が作用してより疎の充填状態を選択していると考えられる。従って、Na⁺結合のDMPGにおいては相転移温度でのリン酸基からNa⁺が解離するのに伴われる(疑似)格子エンタルピーの寄与が大きいために、その結果、この脂質の結晶相→液晶相の相転移エンタルピーが大きくなると考えられる。

文 献

- 1) A. Watts, K. Harlos, W. Maschke and D. Marsh, *Biochim. Biophys. Acta* **510**, 63 (1978).
- 2) A. Watts, K. Harlos and D. Marsh, *Biochim. Biophys. Acta* **645**, 91 (1981).
- 3) J. L. Ranck and J. F. Tocanne, *FEBS Lett.* **143**, 171 (1982).
- 4) J. L. Ranck and J. F. Tocanne, *FEBS Lett.* **143**, 175 (1982).

- 5) D. A. Wilkinson, D. A. Tirrell, A. B. Turek and T. J. McIntosh, *Biochim. Biophys. Acta* **905**, 447 (1987).
- 6) A. J. Verkleij, B. De Kruijff, P. H. J. Th. Ververgaert, J. F. Tocanne and L. L. M. Van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta* **339**, 432 (1974).
- 7) P. H. J. Th. Ververgaert, B. De Kruijff, A. J. Verkleij, J. F. Tocanne and L. L. M. Van Deenen, *Chem. Phys. Lipids*, **14**, 97 (1975).
- 8) P. W. M. Van Dijck, P. H. J. Th. Ververgaert, A. J. Verkleij, L. L. M. Van Deenen and J. De Gier, *Biochim. Biophys. Acta* **406**, 465 (1975).
- 9) K. Jacobson and D. Papahadjopoulos, *Biochemistry* **14**, 152 (1975).
- 10) P. W. M. Van Dijck, B. De Kruijff, A. J. Verkleij, L. L. M. Van Deenen and J. De Gier, *Biochim. Biophys. Acta* **512**, 84 (1978).
- 11) J. M. Boggs and G. Rangaraj, *Biochemistry* **22**, 5425 (1983).
- 12) H. Hauser, *Biochim. Biophys. Acta* **772**, 37 (1984).
- 13) F. Jähnig, K. Harlos, H. Vogel and H. Eibl, *Biochemistry* **18**, 1459 (1979).
- 14) N. Nakashima, S. Asakuma and T. Kunitake, *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 509 (1985).
- 15) M. Kodama, K. Tsujii and S. Seki, *J. phys. Chem.* **94**, 815 (1990).
- 16) M. Kodama, T. Kunitake and S. Seki, *J. Phys. Chem.* **94**, 1550 (1990).
- 17) J. F. Nagle and D. A. Wilkinson, *Biochemistry* **21**, 3817 (1982).
- 18) D. A. Wilkinson and J. F. Nagle, *Biochemistry* **23**, 1538 (1984).
- 19) D. A. Wilkinson and T. J. McIntosh, *Biochemistry* **25**, 295 (1986).
- 20) M. Kodama, *Thermochim. Acta* **109**, 81 (1986).

要 旨

中性 pH 領域で負電荷を有する酸性リン脂質, Dimyristoylphosphatidylglycerol(DMPG)は, 1M濃度のNaClの共存下で多重膜ベシクルを形成する。このベシクルをゲル相温度(~5°C)で熱処理すると, DMPGの親水頭部負電荷がNaカチオンによって中和されるために, 超構造体の結晶性棒状ベシクルが出現し, これは約3倍量の相転移エンタルピーを伴って液晶相に移行することを明らかにした。

国際会議のお知らせ

M²S-HTSC-IV

第4回高温超伝導体国際会議

July 5-9, 1994
Grenoble, France

Deadline for Abstracts: March 1, 1994

Deadline for Early Registrations: May 1, 1994

contract:

M²S-HTSC-IV Secretariat
CNRS,
B. P. 166,
38042 Grenoble Cedex 9, France
Fax: (33)76 88 12 95
Tel: (33)76 88 12 30