

311
229 函
1-3

学位申請論文

伊藤忠直

学位申請論文

伊藤忠直

< 題 目 >

「リン脂質二層膜に対するニ価カチオンの効果」

< 目 次 >

- 1) 要 約 1頁 ~ 2頁
- 2) 序 論 3頁 ~ 9頁
- 3) 実験手段 10頁 ~ 16頁
- 4) 実験結果 17頁 ~ 40頁
- 5) 考 察 41頁 ~ 49頁
- 参 考 文 献 50頁 ~ 53頁
- 図 表 54頁 ~ 79頁
- 謝 辞 80頁

1) 要約

スピントラベル法を用いて、ホスファチジルセリン (PS) - ホスファチジルコリン (PC) およびホスファチジン酸 (PA) - PC 二成分膜系におけるニ価イオンの効果の研究をした。電子スピン共鳴 (ESR) の解析から、これらの二成分膜において、 Ca^{2+} が相分離 (lateral phase separation) を引き起こすことを見出した。PS-PC 膜系では、PS 分子に Ca^{2+} が結合した固相と主に PC 分子からなる液相に相分離し、PA-PC 膜系では、PA 分子に Ca^{2+} が結合した固相と主に PC 分子からなる液相に相分離する。 Ca^{2+} が結合した固相では、そこにあるリン脂質分子の側鎖の運動性は著しく制限を受ける。これらの相分離現象には顕著なイオン選択性がある。PS-PC 膜系では、 Mg^{2+} は相分離を引き起こさないが、 Sr^{2+} および Ba^{2+} は Ca^{2+} と同様に相分離を引き起こす。しかしその程度は、 Ca^{2+} にくさって低い。 Mg^{2+} はこの膜系ではリン脂質分子の側鎖の運動をわづかに制限するだけである。PA-PC 膜系では、 Mg^{2+} は Ca^{2+} と

(2)

同様に相分離を引き起こす。しかしその程度は Ca^{2+} にくらべて小さい。 Sr^{2+} および Ba^{2+} は Ca^{2+} と同じ程度の効果がある。

局所麻酔剤であるテトラカインは、PS-PC膜系では、PS分子の凝集速度をおくろせ、さらにPS分子に結合した Ca^{2+} と置きかわる効果がある。

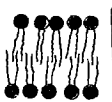
2) 序論

生物は細胞から構成されており、個々の細胞と外界の境界には原形質膜が存在する。細胞の内部には、種々の細胞小器官が存在し細胞小器官もまた膜に包まれている。これらの生体膜は、 100\AA 程度の薄い膜であるが、細胞の機能発現には多種多様な役割を果している。たとえば物質の選択透過性、能動輸送、神経における情報の伝播、処理、電子伝達系におけるエネルギー変換、ホルモン受容、免疫現象における異質分子の認識、細胞間相互作用などの生体现象は、生体膜が重要な役割を果している。

生体膜は 100\AA 程度の薄い膜であるためその構造と機能を研究するには非常に困難をともなってきたが、1960年代には、種々の細胞膜の分離方法が開発され、研究は飛躍的に発展してきた。一方電子顕微鏡やX線解析、蛍光測定、スピラベル法などの物理的方法により生体膜の構造の研究も多くの成果をあげてき

ている。

生体膜の主な構成成分はタンパク質と脂質である。脂質はリン脂質・中性脂質・糖脂質の三種類からなり、いづれも極性基と非極性基をもつ両親媒性の物質である。脂質の中の主要成分はリン脂質であり、二本の疎水性側鎖と極性基をもつ。疎水性側鎖は、さまざまな長さおよび不飽和度の脂肪酸で構成されている。極性基は、 $\text{RO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{P}}-\text{O}-$ の構造をもち、Rとしてはコリン、セリン、エタノールアミン、イノシトール、水素が主なものである。これらのリン脂質はいづれも水溶液中に存在する時は



のように極性基が水と接し、疎水性側鎖が互に集った二層膜構造をとる。さまざまな生体膜のX線解析およびスピンドラベル法により、これらの生体膜では、リン脂質は、二層膜構造をとっており、膜の構造骨格を形成していることを示唆している。

上に述べたことより、生体膜の構造を研究するうえで、リン脂質膜の性質を調べること

は重要な意味をもち、多くの手段を用いて研究がなされてきた。特にスピンドラベル法は個々のリン脂質分子の運動性を調べるのに有力な手段となっている。これまでに多くの研究者によって解明されたことを要約すると、二層膜中のリン脂質分子の脂肪酸側鎖は運動性に富み、ある一定温度以上では液晶状態 (*fluid state*) である。その温度以下では固相状態 (*solid state*) であり、側鎖の運動性はかなり制限を受けている。この温度は脂肪酸側鎖の不飽和度によって異なり、不飽和度が増すほど低くなる(1)。また極性基の種類によっても異なる。液晶状態での、リン脂質分子の膜の横方向の運動 (*lateral diffusion*) はかなり速く、一秒間に約 10^6 回隣接分子と交換する(2)。しかし二層膜を構成している一方の単層膜から他方の単層膜へのリン脂質分子の移行 (*flip-flop*) 速度は非常におそい(3)。中性脂質のコレステロールは二重効果をもち、固相状態のリン脂質二層膜に加えると、膜はやわらかくなりリン脂質分子の

脂肪酸側鎖の運動は活発となるが、液晶状態のリン脂質膜に加えると、脂肪酸側鎖の運動を制限する性質がある(4)。

これらのリン脂質膜中のリン脂質分子の性質は、さまざまな生体膜中のリン脂質分子の性質と一致する。生体膜中のリン脂質は、生理的溫度では液晶状態で流動性に富み、生理的溫度以下で生育した細菌では、不飽和度の大きい脂肪酸側鎖を含むリン脂質を多くしたり、コレステロール含量を減らすことにより膜の流動性を増加させている(5,6)。膜の流動性は膜内にある透過系酵素やATP分解酵素などの活性に影響をおよぼし、固相状態と液晶状態との転移溫度でその活性化エネルギーに不連続的な転移がみられる(7,8)。リン脂質分子は、生体膜中でもリン脂質二層膜と同様に速い *lateral diffusion* をしており(9)、この運動は生合成されたリン脂質が膜面内に均一に分布する原動力となっており。一方リン脂質膜で観測されたリン脂質分子の速い *flip-flop* は、赤血球膜

で観測されている膜内外のリン脂質分子の不均一分布を説明する(10)。生体膜中のリン脂質分子が流動的な状態にあることは、膜内にあるタンパク質の膜面内の *lateral diffusion* および膜面に対して垂直な軸方向の速い回転を可能にしている(11,12)。例えば、各々別の蛍光抗体によって染色されたマウスの細胞と人の細胞をセンドイウイルスによって融合させると、その拡散係数が $0.2 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ の速さで互にまじりあう(11)。

以上のべたことより、リン脂質二層膜中の脂質分子の挙動を研究することは、生体膜の構造と機能を解明するうえに重要な役割を果たすと考えられる。この論文では、スピントラベル法によってなされたリン脂質二層膜における Ca^{2+} 効果の研究についてのべる。スピントラベル法は安定なニトロキシドラジカルをプローブとしてタンパク質や脂質に結合させ、その ESR スペクトルからタンパク質や脂質の動的構造を研究する方法で、先に述べたように生体

膜やリン脂質二層膜の研究にも用いられ多くの成果をあげている。 Ca^{2+} は生体膜の関与する多くの生体现象, 例えば神経膜の興奮・ホルモンの放出 細胞接着などの現象に重要な役割を演じている(13)。しかしこれらの機能に関する Ca^{2+} の役割は現象論的には非常によく研究されているが, 構造的見地からの研究はほとんどなされていない。我々はリン脂質二層膜における Ca^{2+} の効果の研究をスピンドル法を用いておこない, ある種のリン脂質二成分膜において Ca^{2+} が相分離(lateral phase separation)を引き起こすことを見出した。PSおよびPC, またはPAおよびPCからなるリン脂質二成分膜では, Ca^{2+} が酸性リン脂質のPSまたはPA分子に結合することにより, 迅速にかつ可逆的に, PSまたはPA分子の凝集体(aggregate)と主に中性リン脂質のPC分子からなる会合体(cluster)を形成する。凝集体中のPSまたはPA分子は固相状態にあり, その脂肪酸側鎖の運動性は著しく制限をうけている。会合体中の脂質分子は液晶状

態にあり, その脂肪酸側鎖の運動性は Ca^{2+} の影響をうけない。PS-PC膜系では Sr^{2+} および Ba^{2+} は Ca^{2+} と同様の現象を引き起こすが, その程度は Ca^{2+} に比べて小さい。 Mg^{2+} は PS 分子に結合するが, 相分離を引き起こすことはなく, 脂肪酸側鎖の運動性をわずかに制限するのみである。 PA-PC 膜系では, Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} はいずれも PA 分子に結合することにより相分離を引き起こす。しかし Mg^{2+} は Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} にくらべて効果の程度は小さく, Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} は同程度の効果をおよぼす。この現象は, Ca^{2+} が必須の生体膜の生理的機能に重要な役割を果している可能性があり, その点に関して議論する。

3) 実験手段

3-1) リン脂質の調製

PCは Singleton の方法 (14) によって卵黄から抽出し、アルミナクロマトグラフィーによって分離精製した。PSは Sanders の方法 (15) にしたがって牛脳の白質成分から抽出し、DEAE-Cellulose カラムによって分離精製した。PAは卵黄PCにホスホリパーゼDを作用させることによつて作り、そして Kornberg および McConnell の方法 (16) にしたがって精製した。ホスホリパーゼDはキャベツの内側の葉から取り、Yang の方法 (17) にしたがって、Step 3 まで調整し、使用した。各々のリン脂質の純度は、シリカゲル薄層クロマトグラフィー (溶媒 クロロホルム-メタノール-28%アンモニア水 = 170:26:4 V/V) によつて調べ、それぞれ一つのスポットを示した。ホスホタジリノシトールおよびカルジオリピンは Applied Science Co の製品をそのまま使用した。

3-2) スポンラベルしたリン脂質の調製

スポンラベルした PC, 12 PC* および 5 PC* (図式 a) および b)] は、Hubbell と McConnell の方法 (18) にしたがって、スポンラベルしたステアリン酸

12 SAL (4,4'-dimethyl oxazolidine-N-oxyl derivative of 12-Keto stearic acid) および 5 SAL の酸無水物によって卵黄リゾレシチンをアシル化して合成した。12 SAL および 5 SAL は, それぞれ, Waggoner's (19) および Jost's (20) の方法にしたがって合成した。スピンラベルした PA, 12 PA* [図式 C)] は次のべる方法で合成した。20 mg の 12 PC* と 0.1 M の酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液 (PH 5.5) 10 ml にかした 20 mg のホスホリパーゼ D, および 0.1 M CaCl_2 1 ml と 1.5 ml のエーテルの混液を 37°C 3 時間反応させる。反応を 180 mg のクエン酸 1 水和物および 2.5 ml のクロロホルムを加えることによって停止した後, 遠心する。クロロホルム層および沈殿物を集め, 水溶液層をさらに 2.5 ml ずつのクロロホルムで二度抽出する。抽出したクロロホルム層および沈殿物を 2.5 ml の 0.1 M クエン酸で洗い, 沈殿物を除去した後, 窒素気流下で溶媒を 4 ml にまで濃縮する。クロロホルム層は 1 ml の 0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (PH 5.2) でインキュベーションした後 1 ml の水で洗い, 窒素

気流下で乾燥させる。乾燥物をシリカゲル薄層クロマトグラフにチャージし、クロロホルム-メタノール-28%アンモニア水(70:26:4 V/V)で展開する。スピララベルした12PA*のスポットの位置は、卵黄PCから作ったPAとほぼ一致した。PCおよびリゾPAに対応するスポットはなかった。展開溶媒の先端の位置に微量のスポットが観測されたが、それ以上の精製はおこなわなかった。

スピララベルしたPS分子, 12PS* [図式d)] は, スピララベルしたCDP-ジグリセリドを基質として, 大腸菌から抽出したPS合成酵素(21)を作用させて, 次ののべる方法で合成した。概要は図1に示してある。

a) スピララベルしたCDP-ジグリセリドは12PA*と *cytidine-5'-monophosphomorpholidate* とを反応させてつくった。この方法は, Aganoff および Suomi の方法(22)とほぼ一致する。12PA* (220 mg) を 10 ml ベンゼンに溶かし, ドライアイス-アセトン温度で凍結させる。212 mg の *cytidine-5'-monophos-*

(13)

phoromorpholide (これは cytidine-5'-monophosphate と merpholine とを dicyclohexylcarbodiimide によって脱水縮合させることによつて合成 (23)) を 10 ml のベンゼンに分散させ、凍結乾燥させることによつてベンゼンを完全に除去する。それに 40 ml の乾燥ピリジンを加え、反応容器を密栓して、室温で 65 時間反応させる。その後反応混液は、30°C 真空下で蒸発乾固させる。その残留物に 20 ml の氷冷した水を加え、さらに 1 N の蟻酸を加えることによつて pH 4 にする。そして 40 ml のメタノールと 30 ml のクロロホルムを加え、二層に分離させ、上層を除去し、再度 30 ml のクロロホルムで抽出する。そのクロロホルム抽出液を下層に加え、それに 38 ml のメタノール-水 (2:1 v/v) を加え 2 N のアンモニアで上層の pH を 7.6 にする。下層は二度メタノール-水で洗いその上層を最初の上層に加える。集めた上層の溶媒を真空中でとばし、さらに 10 ml ベンゼンを加え、凍結乾固する。製成物は、約 120 mg であり、そのうち約 20% の PA* と 30% の水が含

まれていた。これをさらに精製することなく次の段階に進んだ。

b) 12 PS* は PS 合成酵素を働かせ、スフィンラベルした CDP-ジグリセリドと L-セリンとを反応させてつくった。反応液 100ml 中には、100mg のスフィンラベルした粗 CDP-ジグリセリドと 5 mM の L-セリンと 0.1% の表面活性剤の Cutscum (Fisher Scientific Co) および 1,800 ユニットの PS 合成酵素および 33 mM のリン酸カリウム緩衝液を含む。37°C, 40 分反応させ、450 ml のクロロホルム-メタノール (2:1 v/v) を加えることによって反応をとめる。800 ml の 2 M KCl と 900 ml の水で洗浄後、クロロホルム層は真空中で乾燥させる。脂質層はシリカゲル薄層クロマトグラフィー〔展開溶媒 クロロホルム-メタノール-酢酸 (65:25:8 v/v)〕を用いて分離した。PS に対応するスポットの部分をかきとり、クロロホルム-メタノール (2:1 v/v) で抽出し、21 mg の 12 PS* を得た。

3-3) リン脂質膜の調製

本研究では、リン脂質膜は、直径 5 μ の

ミリポアフィルター (SMWP 02500) 上に作製した。合わせて 10 mg のリン脂質およびリン脂質ラベルを密栓付きの小さなガラス管に入れ、まず乾燥窒素、つきに真空ポンプで引いて溶媒を完全にとばす。それに 0.2 ml のベンゼンを加え、約 0.5 cm × 0.4 cm の大きさのミリポアフィルターをその溶液に浸す。10 分間浸した後、フィルターを室温で約 2 時間乾かす。ミリポアフィルターに付いた脂質の量は、およそ 0.33 mg である。乾燥したミリポアフィルターは、少なくとも 2 時間 100 mM KCl 溶液に浸す (conditioning)。conditioning したミリポアフィルターをそれぞれの塩溶液に浸して ESR スペクトルを測定する。

3-4) 試薬および塩溶液

全ての塩溶液には記載する塩以外に 100 mM KCl を含んでいる。中性の pH は 100 mM KCl - 50 mM Tris HCl 緩衝液で調整した。蒸留水中の pH は 5~6 であった。CaCl₂, MgCl₂ · 6H₂O, SrCl₂ · 6H₂O および EDTA は半井化学薬品会社から購入した試薬特級を用い、BaCl₂ は Merck-Co 製の特級を使用した。

テトラカインは Sigma Chemical Co から購入したテトラカイン塩酸塩を更に精製することなく使用した。

3-5) ESRの測定

スピラベルしたリン脂質膜を張ったミリポアフィルターはティッシュセルに少量の母液を加えて測定した。ESRの装置は、温度可変装置をそなえた日本電子製のX-バンド (JELCOME-2X) を使用した。

4) 実験結果

4-1) ミリポアフィルターに張った脂質膜の ESR スペクトル

図 2 にミリポアフィルターに張ったリノ脂質膜 PC-5PC* (100=1) および PC-12PC* (100=1) の ESR スペクトルが示してある。これは超音波処理によってつくった小胞状リン脂質二層膜中のスピラベル分子の ESR スペクトルと一致する。この ESR の解析は、Hubbell および McConnell によって詳細になされている (18)。彼らはラベルしたリン脂質分子の脂肪酸側鎖が、そのオールトランス方向を回転軸として、速い異方性回転をしていることを示した。その解析結果をここで要約してみる。

分子運動のない場合、ニトロキシドラジカルのスピノハミルトニアンは

$$\mathcal{H} = \beta S g H + h S T I \quad (1)$$

と記することができる。ここにおいて、 H は外部磁場ベクトル、 g および T は、 g -factor および hyperfine テンソルである。 S と I はそれ

を核電子スピンのオペレーターである。ニトロキシドラジカルの場合の g および T の主軸 x, y, z は図3b) に示してある。分子運動がある場合には、ハミルトニアンは時間に依存する。そのハミルトニアンを $\mathcal{H}(t)$ とし、時間に依存する項と依存しない項に分けると

$$\mathcal{H}(t) = \mathcal{H}' + \{ \mathcal{H}(t) - \mathcal{H}' \} \quad (2)$$

と記することが出来る。この時 \mathcal{H}' は

$$\mathcal{H}' = |\beta| S g' H + h S T' I \quad (3)$$

であり、 g' 、 T' はそれぞれ時間で平均化された g -factor および hyperfine テンソルである。リン脂質二層膜中のスピンラベルされた脂質分子の ESR スペクトルは、その脂肪酸側鎖が、オルトランス方向を回転軸として、速い異方性回転をする結果、(2) 式の時間とともに揺動する項 $\{ \mathcal{H}(t) - \mathcal{H}' \}$ が平均化されて消去でき、**時間に依存しない** ハミルトニアン \mathcal{H}' のみで記述できる。時間に依存しない hyperfine テンソル T' (または g') の主軸系を (x', y', z') とすると、図3a) に示すように脂肪酸側鎖のオルトランス方向が z' 軸となる。

(3) 式の主軸系の z' 軸が (1) 式の主軸系の (x, y, z) と立体角 (α, β, γ) をなす場合, それぞれの主値の間には

$$g_{z'z'} = \alpha^2 g_{xx} + \beta^2 g_{yy} + \gamma^2 g_{zz}$$

$$T_{z'z'} = \alpha^2 T_{xx} + \beta^2 T_{yy} + \gamma^2 T_{zz}$$

なる関係式が成り立つ。これより

$$T_{z'z'} = a + \frac{1}{2} (T_{zz} - T_{xx}) (3\gamma^2 - 1) \quad (4)$$

が導びかれる。 a は hyperfine 相互作用の等オ性成分であり, $a = \frac{1}{3} \text{Tr}(T) = \frac{1}{3} \text{Tr}(T')$ である。

$$(4) \text{ 式より, } (3\gamma^2 - 1) = \frac{2}{3} \frac{2T_{z'z'} - (T_{x'x'} + T_{y'y'})}{T_{zz} - T_{xx}} \quad (5) \text{ となる。}$$

今スピンのラベルした脂肪酸側鎖が z' 軸を回転軸として, 速い異オ性回転をする場合には,

T_{xx} および $T_{y'y'}$ は平均化されて等しくなる。その

$$\text{値を } T_{\perp} \text{ とし, } T_{zz} = T_{\parallel} \text{ とおき, } S = \frac{T_{\parallel} - T_{\perp}}{T_{zz} - T_{xx}} \quad (6)$$

なるパラメーター S を導入すると, (5) 式および (6) 式より

$$S = \frac{3}{4} (3\gamma^2 - 1) \quad (7) \text{ となる。}$$

S は「オーダーパラメーター」と呼ばれ, 回転軸 z' とニトロ

キシドラジカル基に固定された主軸 Z との傾きの角度に依存する。ラベルされたオキサゾリジン環はアルキル鎖に固く結合しているので、脂肪酸側鎖の回転運動が、回転軸 Z' に対して大きな角度をもつほど、 Z と Z' とのなす角度 θ は大きくなり、 S 値は小さくなる。換言すれば S 値が小さいほど脂質二層膜中のラベルされた脂肪酸側鎖の運動性が增大することになる。固体無定形資料の ESR スペクトルで解析されている場合と同様にして、この場合にも T_{\parallel} および T_{\perp} の値を実測のスペクトルから求めることができる(18)。図2に示したように、最高磁場および最低磁場の位置の吸収曲線のピーク位置の差が $2T_{\parallel}$ であり、その内側の吸収曲線のピーク位置の差が $2T_{\perp}$ となる。ラベルされた脂肪酸側鎖の運動性のパラメータとして S 値の代わりに T_{\parallel} または T_{\perp} の値を用いる場合がある。

(4) 式および(6)式より

$$T_{\parallel} = \frac{2}{3} S (T_{zz} - T_{xx}) + a \quad (8) \text{ となり}$$

また $T_{\perp} (T')$ = $T_{\parallel} + 2T_{\perp} = 3a$ と(8)式より

$$T_{\perp} = a - \frac{1}{3}S (T_{zz} - T_{xx}) \quad (9) \quad \text{となる。}$$

$(T_{zz} - T_{xx})$ および a は分子運動に依存しない値である。(8)式および(9)式より T_{\parallel} が大きいほど、または T_{\perp} が小さいほど、 S 値は大きい、すなわちアルキル鎖の運動性が制限されていることがわかる。運動性が大きい場合には、しばしば T_{\parallel} の値がスペクトルから正確に求められずその場合には T_{\perp} の値を運動性のパラメータとして用いる。

図2のスペクトルと全く同じように、リン脂質二層膜中のラベルされた脂質分子の ESR スペクトルは、脂肪酸側鎖中のニトロキシド基の位置によって異なる。PC-5PC* では $S=0.88$ であり PC-12PC* では $S=0.46$ となる。このことよりリン脂質二層膜では、脂肪酸側鎖の運動性は、二層膜の内側へ行くほど増大することがわかる。リン脂質二層膜の流動性は一様でなく、膜の内側へ行くほど、流動性が増大する。

図2a)に示されているようにミリホアスルターに張ったリン脂質膜中のラベル分子の ESR

スペクトルは、外部磁場に対して異方性を示す。例えば PC-5PC* (200:1) の脂質膜では、外部磁場をフィルター面に垂直にかけた場合、 T_{\parallel} の位置のピークの高さは、平行にかけた場合よりも高く T_{\perp} の位置のピークの高さは低い。これはミリポアフィルターに張った膜が配向していることを示し、その膜がラメラ二層膜構造をとっている結果と考えられる。またミリポアフィルターに張った膜をオスミウム染色することにより電子顕微鏡で観察するとリン脂質分子がラメラ二層構造をとっているのが観測できた(24)。

4-2) PS膜およびPA膜におよぼす pH の効果

PS-12PS* (100:1) および PA-12PA* (100:1) 膜の ESR スペクトルは、溶液中の pH によって変化する。図 4 に PS-12PS* (100:1) 膜のいろいろな pH での ESR スペクトルが示してある。中性での $2T_{\parallel}$ の値は 42G であるが、pH 2.1 では $2T_{\parallel} = 54.2G$ と著しく変化する。pH 3.1 では $2T_{\parallel} = 54.2G$ と $2T_{\parallel} = 42G$ が重なったスペクトルとなる。 $2T_{\parallel} = 54.2G$ のスペクトルは、二層膜中でラベルされたリン脂質分子の運動性が

著しく制限されていることを示し(固相スペクトル),
 $2T_{11} = 42G$ のスペクトルは, その運動が比較的
自由である(液晶相スペクトル)ことを示す。
液晶相スペクトルと固相スペクトルの量比は
pHによって異なり, pHの増加とともに液晶相
スペクトルが増加する。pH 5.2では液晶相スペ
クトルのみになる。いろいろなpHにおける
固相スペクトルの割合が図5に示してある。
固相スペクトルが50%の割合を占めるpHは3.5
で, これはPS分子のカルボキシル基およびリン
酸基のPK値(4.0および3.7(25))とほぼ一致する。
以上のことよりPS=層膜は, pH3.5で相転移し,
それより低いpHでは固相状態であり, 高いpHで
は液晶相状態であることがわかる。液晶相か
ら固相への転移はPS分子の極性基のカルボキ
シル基とリン酸基がプロトン化することによ
り, 極性基間の相互作用(例えば水素結合)が
増加する結果生じると考えられる。

PA-12 PA* (50:1)膜においても, pHの減少にともな
う脂肪酸側鎖の運動性の減少がみられる。図

6 に示されているように pH 7.9 で $2T_{\perp} = 21.3\text{G}$, pH 5.6 で $2T_{\perp} = 20.5\text{G}$ となる。この変化は、リン酸基の負電荷が酸性溶液中で減少する結果、膜内分子の配列度が密になり、その側鎖の運動性が減少したものと考えられる。

中性リン脂質からなる PC-12PC* 膜では、その ESR スペクトルは pH によって変化しなかった。

4-3) PS 膜および PA 膜に対する二価カチオンの効果、PS-12PS* (100:1) および PA-12PA* (100:1) の ESR スペクトルは、溶液中に二価カチオンが存在すると著しく変化する。図 7 に PS-12PS* 膜が Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} または Ca^{2+} を含む溶液中にあるときの ESR スペクトルが示してある。 Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} 存在下での $2T_{\parallel}$ の値はそれぞれ 42.2G , 54.2G , 43.1G および 42.9G となり、一価イオンのみの溶液に存在する時の 42G よりも大きな値を示す。特に Ca^{2+} は著しい影響をおよぼす。これは PS 分子に Ca^{2+} が結合することにより、膜内分子の脂肪酸配列度が著しく密になり、二層膜が固相状態になったことを示す。

図 8 には PA-12PA* 膜の Ca^{2+} および Mg^{2+} 溶液中の ESR スペクトルが示してある。 Mg^{2+} および Ca^{2+} 溶液中の $2T_{11}$ の値はそれぞれ 48.0 G および 52.4 G となり、一価イオンのみの溶液中の 45.6 G よりも大きくなる。 Sr^{2+} および Ba^{2+} は Ca^{2+} と同程度の効果を示した。

中性リン脂質の PC からなる PC-12PC* 膜では、これらの二価イオンは効果を示さず、一価イオンのみの溶液中のスペクトルと同じであった。

以上の結果から次のことが明らかになった。

i) 酸性リン脂質 PS または PA からなる二層膜は、 Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} により膜の流動性が減少する。

ii) PS 膜では Ca^{2+} が他のイオンにくるべ著しい効果を示し、膜を固相状態にする。

iii) 中性リン脂質の PC 膜では、これらのイオンは効果を示さない。

4-4) PS-12PC* および PA-12PC* 膜に対する二価カチオンの効果

酸性リン脂質 PS または PA と、中性リン脂質 PC からなるリン脂質二成分膜に対する二価カ

チオンの効果の研究を中性リン脂質ラベル PC^* を用いておこない次の結果を得た。

〈 Ca^{2+} による PC^* の会合体の形成〉

図9にPS-12 PC^* (9=1) 膜の100mM K^+ および100mM K^+ 10mM Ca^{2+} 溶液中のESRスペクトルが示してある。 Ca^{2+} が存在するとスペクトルの線幅は著しく増大する。この Ca^{2+} による線幅の増大は10mM EDTA を加えることにより10分以内にすみやかに解消する。図10にPSと(PC+5 PC^*)の比を9=1とし、PCと5 PC^* の比をさまざまに値にした時の Ca^{2+} 溶液中のスペクトルが示してある。これからわかるように、PCに比べて5 PC^* の割合が多くなればなるほど、スペクトルの線幅は増大する。5 PC^* 含量の少ないPS-PC-5 PC^* (180=19:1) の膜では、ほとんど Ca^{2+} による線幅の増大はみられない。しかも、いずれのスペクトルもラベル分子の脂肪酸側鎖の運動性のパラメータとなる $2\tau_{11}$ の値は Ca^{2+} のあるなしにかかわらず57Gとなる。以上のべた実験結果より、 Ca^{2+} によるPS- PC^* 膜のスペクトルの線幅の増大は、ラベル分子の運動性に

よるものでなく、ラベル分子間のスピンスピン相互作用の増大によつて生じたものと結論できる。すなわち PS-PC* 膜に Ca^{2+} を加えると PC* の会合体を生じる結果、ラベル分子間のスピンスピン相互作用が増大したと考えられる。また会合体中の PC 分子の脂肪酸側鎖の運動性は Ca^{2+} によつて影響をうけず液晶相のままである。

図 11 に PA-12PC* (9:1) 膜の ESR スペクトルにおよぼす Ca^{2+} の効果を示してある。PS-12PC* 膜と全く同様に PA-12PC* 膜においても、 Ca^{2+} が 12PC* の会合体を生じさせることがわかる。しかし他の酸性リン脂質のホスファチジルイノシトールまたはカルジオリピンおよび 12PC* からなる二成分系では、 Ca^{2+} は 12PC* の会合体を生じさせなかった。

< PC* 会合体の大きさおよび形成速度 >

図 12 に 12PC* の含量の異なる PC-12PC* 膜の Ca^{2+} 溶液中の ESR スペクトルを示してある。 Ca^{2+} による線幅の増大は、膜中の 12PC* の含量が多少いかに大きく、PS-12PC* (9:1) 膜では、(50:1) 膜よりも

著しく線幅が増大している。図13にはいろいろな含量の $12PC^*$ を含む $PC-12PC^*$ 膜の $100_mM K^+$ のみを含む溶液中のESRスペクトルが示してある。これらのスペクトルも $12PC^*$ の含量の多いところでは、分子間スピンスピン相互作用による線幅の増大がみられる。分子間スピンスピン相互作用のあるスペクトルの形状の特徴は $12PC^*$ の含量の少ない、即ち分子間相互作用の小さいスペクトルほど中央のピークの高さが低磁場側のピークにくらべて高くなることである。図12の Ca^{2+} 溶液中のスペクトルは図13の K^+ のみの溶液中のスペクトルにくらべ低磁場側のピークの線幅が広くて、中央のピークの高さが高くなっている。これは Ca^{2+} 溶液中のスペクトルが、分子間相互作用の異なるさまざまなスペクトルが重なったものとして説明できる。図13の一樣な分子間相互作用をもつ、線幅のいろいろなスペクトルに線幅のせまいスペクトルが重なると低磁場側のピークの線幅が広くなり、中央のピークの高さが高くなる。

分子間スピンスピン相互作用の大きさは、 PC^* 会合体の大きさによると考えられる。 PC^* 会合体が小さいと、 PC^* 分子はラベルしていない PS 分子とも相互作用することにより、ラベル分子間同志のスピンスピン相互作用は小さくなる。 PC^* 会合体が充分大きいと、 PC^* 分子は PC^* 分子とのみ相互作用することにより、スピンスピン相互作用は大きい。以上の解析より、 Ca^{2+} によって生じる PC^* の会合体の大きさは不均一であり、 PC^* 含量のおおい膜ほど大きい会合体が多く分布すると考えられる。

PS-12 PC^* 膜の Ca^{2+} による線幅増大の速度は、 Ca^{2+} 濃度に依存する。図14に 0.1 mM から 10 mM Ca^{2+} を含む 100 mM K^+ 溶液中に PS-12 PC^* (50:1) 膜を 10 分間浸した後の ESR スペクトルが示してある。2 mM 以下の濃度では線幅の増大は少ない。この線幅の増大は Ca^{2+} 濃度の増加とともに大きくなっていく。2 mM 以上の濃度では、ほぼ同程度の線幅の増大を示す。図15にいろいろな Ca^{2+} 濃度での線幅増大の時間依存性が示してある。

この図では線幅のパラメーターとして低磁場側のピークの半値幅をとっている。この図からわかるように線幅増大の速度は Ca^{2+} 濃度に依存し低濃度では、その速度は遅い。例えば、 0.5mM Ca^{2+} 濃度では線幅の増大が最大に達するには、18時間かかるが、 2mM 以上の濃度では10分以内に最大に達し、その大きさはともに同じである。

〈 Ca^{2+} 以外の二価カチオンの効果〉

図16に Ca^{2+} 以外の二価カチオン、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Sr^{2+} 溶液中のPS-12PC* (9:1)のESRスペクトルが示してある。 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} は Ca^{2+} と同様にそのESRスペクトルの線幅を増大させるが、 Ca^{2+} に比べてその効果の程度は少なく、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Sr^{2+} の順となる。しかし Mg^{2+} 溶液中では線幅の増大は全く観測されずKClのみ溶液と同じであった。このことは Mg^{2+} は他のイオンと異なり、PC*の会合体を生成させないことを示す。 Mg^{2+} の効果は5PC*を用いて明らかになった。図17にPS-5PC* (50:1)膜のESRスペクトルにおよぼす Mg^{2+} の効果を示して

ある。 Mg^{2+} 存在下では $2\pi = 59G$ であり KCl のみの溶液中の $2\pi = 57G$ よりも大きくなっている。さらに Mg^{2+} が存在すると、図17a) に示されているように外部磁場に対するスペクトルの異方性が増加している。以上のことより Mg^{2+} は脂質分子の脂肪酸側鎖の運動性を少し制限する。また外部磁場に対する異方性を増加させていることより二層膜の配向性を増加させる効果をもっている。

図18 に PA-12PC* (7:1) 膜におよぼす、 Ca^{2+} 以外の二価カチオン、 Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} の効果が示してある。PA-12PC* 膜では Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} はいずれも線幅の増大をもたらし、PS-12PC* 膜で見られるような著しいイオン選択性はない。線幅増大の効果の程度は、 Mg^{2+} が一番小さく、 Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} は同程度の効果をおよぼす。

以上 4-3) 節の結果より、次のことが明らかになった。

i) PS-PC または PA-PC 二成分膜は、 Ca^{2+} 溶液中に存在すると、PC分子の会合体を生じる。会合体中の

PC分子の脂肪酸側鎖の運動性は、 Ca^{2+} によって影響をうけず、液晶相のままである。

ii) PC会合体の大きさは不均一であり、PC含量の多い膜ほど大きな会合体の分布が増加する。

iii) PC会合体の形成速度は充分速く、PS-PC膜では 2mM 以上の Ca^{2+} 濃度では10分以内に会合体は形成し終る。EDTAにより Ca^{2+} をのぞくとすみやかに会合体は解消する。

iv) PS-PC膜では他の二価カチオン Sr^{2+} , Ba^{2+} は Ca^{2+} と同様PC会合体を発生させるが、その効果は Ca^{2+} にくらべて弱い。しかし Mg^{2+} は全くPC会合体を形成せず膜を少し固くするだけである。

v) PA-PC膜では、 Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} は Ca^{2+} と同様PC会合体を発生させる。その効果は Mg^{2+} が一番弱く、 Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} は同程度の効果を示す。

vi) 他の酸性リン脂質のホスファチジルイノシトール-PC およびカルジオリピン-PC膜では、 Ca^{2+} によりPC会合体は生じない。

4-4) PS^*-PC および PA^*-PC 膜に対する Ca^{2+} イオンの効果

4-3) 節では, 中性リン脂質のラベル $5PC^*$ および $12PC^*$ を用いて, $PS-PC^*$ および $PA-PC^*$ 膜の ESR スペクトルにおよぼす Ca^{2+} イオンの効果の結果を示したが, この節では, Ca^{2+} イオンが直接相互作用する酸性リン脂質のスピンラベル $12PS^*$ および $12PA^*$ を用いた結果についてのべる。

< Ca^{2+} による PS 凝集体の形成 >

図 19 に $PS-12PS^*-PC$ ($X:0.5 \ 100-X$) 膜で X の値をいろいろに変えた場合の Ca^{2+} 溶液中の ESR スペクトルが示してある。このスペクトルの特徴は, $2T_{II}$ の大きい成分と $2T_{II}$ の小さい成分が重なっていることである。膜中の PS 分子の割合, すなわち X の値が増加すると, $2T_{II}$ の大きい成分が増加する。 $X=67$ のスペクトルではほぼ $2T_{II}$ の大きいスペクトルのみかゝる。大きい方の $2T_{II}$ の値は $54.2G$ で, これは $PS-12PS^*$ ($100:1$) 膜の Ca^{2+} 溶液中の $2T_{II}$ の値と一致し, 小さい方の $2T_{II}$ の値は $42G$ でこれは $PC-12PS^*$ ($100:1$) 膜の一価イオンの

みの溶液中の値と一致する。それぞれの 2π の値は χ の値によらず一定である。PS と 12PS* はほぼ同じ挙動を示すと考えることより、以上の結果から、PC-PS膜では Ca^{2+} が PS 分子に結合することにより PS 分子の凝集体が形成され、その凝集体中の PS 分子の脂肪酸側鎖の運動性は著しく制限をうけている、すなわち凝集体は固相状態であることが結論できる。また 2π の値の小さいスペクトルは液晶相中の 12PS* のスペクトルと考えられることより、PS 分子は、主として PC 分子からなる会合体中にも存在することがわかる。図 20 に χ のさまざま値に対して凝集体中にある 12PS* の割合 f が示してある。この測定は、コンピュータを使って液晶相のスペクトルと固相のスペクトルをいろいろな比で重ね合せ、実測のスペクトルと一致させることにより、固相中の 12PS* の割合を求めた。PS 含量の少ない $\chi=10$ では、凝集体を形成している 12PS* の割合 f も小さく $f=0.03$ となり大部分の 12PS* は PC 会合体中に存在する。

PS含量が比較的多い $X=67$ では、 $f=0.86$ となり、ほぼ大部分の $12PS^*$ は PS凝集体中に存在している。PS分子と $12PS^*$ 分子とはほぼ同じ挙動を示すと考えられることより、この結果は PS-PC二成分膜が Ca^{2+} 溶液中に存在する時の性質を示していると考えられる。

〈PS凝集体の形成速度〉

図21に PS- $12PS^*$ -PC ($X:0.5:100-X$) 膜を用いて、PS分子の Ca^{2+} による凝固体形成の時間依存性が示してある。凝集体形成の速度は、PSの割合 X に依存し、 $X=67$ では5分以内に完了するが $X=10$ では数時間かかる。またこの形成速度は温度に依存し、高温になるほど速くなる。

〈 Ca^{2+} による PA^* 凝集体の形成〉

PC-PA膜系では、 $12PA^*$ -PC膜を用いて Ca^{2+} の効果を調べた。図22に $12PA^*$ -PC (1:9および1:4)膜の Ca^{2+} による ESRスペクトルの変化が示してある。 Ca^{2+} が存在すると、その ESRスペクトルは、線幅の広いスペクトルと線幅のせまい、鋭いスペクトルの重なったものとなる。このスペクト

ルからコンピュータを用いて線幅のせまいスペクトル(図23のc))を引くと図22のa)およびb)はそれぞれ図23のa)とb)となる。この線幅の広いスペクトルは、12PA*同志のスピン-スピン相互作用が増大した結果生じたものであり、このことは Ca^{2+} が12PA*に結合し、12PA*の凝集体を生じたことを直接示す。また線幅のせまい図23のd)のスペクトルは12PA*-PC(1:50)の-価イオンのみのスペクトルと一致し、PC会合体中の12PA*分子のスペクトルと考えられる。図22のa)およびb)のうちで図23のa)およびb)が占める面積は12PA*-PC膜中の12PA*の凝集体を形成している割合に一致する。このことより(1:4)膜では、86%(1:9)膜では95%の12PA*が凝集体を形成していることがあがる。

以上4-4)節の結果より次のことが明らかになった。

i) PS-PCまたはPC-PA=成分膜が Ca^{2+} 溶液中に存在すると、 Ca^{2+} がPS(またはPA)に結合することにより、PS(またはPA)の凝集体を生じる。凝集体中

の PS (または PA) 分子の脂肪酸側鎖の運動性は著しく制限さうけており凝集体は固相状態である。

ii) Ca^{2+} により凝集体を形成する PS (または PA) 分子の割合は、膜中の PS (または PA) の含量に依存し、含量が多いほど多くなる。

4-3) 節および 4-4) 節の実験結果より、酸性リン脂質 PS または PA と、中性リン脂質 PC からなる二成分膜が Ca^{2+} 溶液中に存在すると、PS または PA の凝集体の固相と、主として PC からなる液晶相に相分離することが明らかにになった。

4-5) Ca^{2+} による PS-PC 膜の相分離におよぼす Mg^{2+} および局所麻酔剤テトラカインの影響

Ca^{2+} が関与する生体現象のなかには、 Mg^{2+} が Ca^{2+} の効果を拮抗的に阻害する場合が多くある。また局所麻酔剤は、生体膜に作用して、神経膜の興奮や細胞接着などの Ca^{2+} が関与する生体現象を抑制する (26, 27)。ここでは Ca^{2+} による

PS-PC膜の相分離におよぼす Mg^{2+} および テトラカインの効果についてのべてみる。

〈 Mg^{2+} の効果 〉

図 24 に $50_mM Mg^{2+}$ および $10_mM Ca^{2+}$ を含む $100_mM K^+$ 溶液中の PS-12PC* (50:1) の ESR スペクトルが示してある。 $100_mM K^+$ のみの液から $50_mM Mg^{2+}$ および $10_mM Ca^{2+}$ を含む液に移して 10 分後のスペクトルは、線幅のせまいスペクトルと線幅の広いスペクトルの重なったスペクトルを与える。この液に移して 1 時間後のスペクトルは、線幅のせまいスペクトルが減少し、 $10_mM Ca^{2+}$ のみが存在する液に移したスペクトルとほぼ一致する。このことより、 Mg^{2+} は Ca^{2+} による PS-PC 膜の相分離の速度を遅らせることがわかる。これは Mg^{2+} と Ca^{2+} との PS 分子に対する結合が拮抗する結果と考えられる。

〈 テトラカインの効果 〉

図 25 には、PS-12PC* 膜を $100_mM K^+$ から $10_mM Ca^{2+}$ および 10_mM テトラカインが共存する液に移した時のスペクトルが示してある。 Mg^{2+} と同様 テトラカインも

Ca^{2+} による相分離の速度をおくろせる。テトラカインと Ca^{2+} が共存する液に糊してかゝ4.5時間たった後でもそのESRスペクトルは、 $10\text{mM}\text{Ca}^{2+}$ のみが存在する溶液中のスペクトルほど幅広くなく、そのうえ線幅がせまくかつ2T₀の大きいスペクトルが顕著に観測される(図25b)。この2T₀の大きいスペクトルは、PS凝集体中の12PC*のスペクトルと考えられる。以上のことより、溶液中に Ca^{2+} とテトラカインが共存すると Ca^{2+} によるPS-PC膜の相分離の速度は遅くなり、またPS凝集体中に存在するPC分子の量が少くなることわかる。またPS-12PC*膜を $100\text{mM}\text{K}^+$ のみの溶液から、 $100\text{mM}\text{K}^+$ および 10mM テトラカインを含む溶液に糊すと、そのスペクトルの2T_±の値は約36%減少する。このことは、テトラカインが直接PS-PC膜に作用して、脂質分子の脂肪酸側鎖の運動性を少し抑制することを示す。リン脂質膜および生体膜に対する局所麻酔剤の効果はさまざまにスピソラベル試薬を使って研究されている(28,29,30,31)。これらの結果は、コレ

ステロール含量を減らした脳から抽出した脂質膜の結果を除いて(31), いづれも麻酔剤によつて膜中の脂質分子の脂肪酸側鎖の運動がより自由になることを示している。しかしながら, ここでの結果は, PS-PC膜において, テトラカインはこの膜の流動性をわずかに減少させるということを示している。このことはテトラカインとPS分子が特異的に相互作用した結果と考えられる。一分子のテトラカインが二分子のPS分子と複合体をつくることが Feinstein によつて示されている(32)。テトラカインのPS-PC膜に対するもう一つ別の作用として, Ca^{2+} による相分離がすみやかに解消するということがある。PS-12PC膜を $10_{mM} Ca^{2+}$ を含む溶液から 10_{mM} テトラカインを含む溶液に移すと, スピンスピン相互作用による線幅の増大はすみやかに解消し, 2時間後のスペクトルでは, 線幅の増大はみられない。これはPS分子に結合した Ca^{2+} がテトラカインとあきかわつたためと考えられる。 Mg^{2+} はこの作用は示さない。

5) 考察

4章の実験結果から、酸性リン脂質 PS または PA と中性リン脂質 PC からなるリン脂質二成分膜では、 Ca^{2+} が PS または PA に結合することにより PS または PA の凝集体からなる固相と、主として PC の集合体からなる液晶相に相分離することが明らかになった。この章では相分離を引き起こす原因、および PS-PC 膜での相分離のイオン選択性の機構などを考察し、この相分離現象の脂質二層膜の物性におよぼす影響および生体膜の機能への関与の可能性について調べてみる。

5-1) 相分離現象およびそのイオン選択性の機構

Ca^{2+} による PS-PC あるいは PA-PC 膜の相分離現象は、 Ca^{2+} の結合による PS または PA 分子の凝集体の形成によって生じるエンタルピーの減少がエントロピーの減少 ($T\Delta S$) よりも大きい場合におこる。リン脂質二成分膜系ではエンタルピーに寄与する項として分子間相互作用、エントロ

に寄与する項として、脂質分子間の混合エントロピーおよび側鎖のアルキル鎖の膜内での自由度に関連した構造エントロピー (configurational entropy) が考えられる。先にのべた分子間相互作用エネルギーとしては、極性基間同志の電荷によるクーロンエネルギーおよび脂肪酸側鎖のファンデルワールスエネルギーがある。4章の実験結果より、 Ca^{2+} によって PS-PC または PA-PC 膜に相分離が生じると、i) 固相中の PS または PA の側鎖間のファンデルワールス力の増大が系のエントロピーの減少をもたらすこと、ii) 二相にわかれることによる混合エントロピーの減少および固相中の脂肪酸側鎖の運動の制限による構造エントロピーの減少が系のエントロピーの減少をもたらすことがわかる。また Ca^{2+} が極性基に結合することにより、極性基の負電荷による反撥を減少させ、PS または PA 分子同志の結合エネルギーを増加させていると考えられる。しかし Ca^{2+} が PS (または PA) - 分子のみに結合する場合には相分離は生じ得ない。この場合には Ca^{2+}

の結合はPS(またはPA)の極性基間の電荷による反撥を中和するだけであり,それによるPS(またはPA)分子同志の結合エネルギーの増大が,相分離によって生じる混合エントロピーおよび構造エントロピーの減少よりも大きいとは考えられない。さらに4章の実験で用いたPS(またはPA)分子は多くの不飽和脂肪酸を含む(15,14)。リン脂質分子が,側鎖にcis型不飽和脂肪酸を含む場合,膜中での側鎖の配列が密になりにくいことが知られている(1)。このことより,極性基間の反撥が減少しただけで,その脂肪酸側鎖が4章の実験で示されたほど密に配列することは不可能と考えられる。以上のべたことにより, Ca^{2+} によるPS-PC(またはPA-PC)膜における相分離の機構として, Ca^{2+} が膜内のPS(またはPA)に,その分子間同志を架橋するように結合する結果,PS(またはPA)の凝集体が形成される。 Ca^{2+} の分子間結合により,凝集体中のPS(またはPA)分子は互に近距離に接近し,その脂肪酸側鎖の配列度が非常に密な固相状態となる。この

凝集体が形成される結果, PC分子は凝集体中から排除されて会合体を形成すると考えられる。

4-4) 節で示したように, PS-PC膜では, 凝集体形成の速度はPSの含量によって著しく異なりPS含量が多くなるほど速くなる。膜内のリン脂質分子の膜面内での拡散 (lateral diffusion) は, その拡散係数が $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{sec}$ (2) で, 十分に速くそのためこれが凝集体形成の律速段階ではないと考えられる。凝集体の形成は一種の「結晶化」現象と考えられ, まず最初に Ca^{2+} が分子間を架橋した小さな凝集体ができ, これが「核」となってそれに液晶相のPSが Ca^{2+} によって結合していき, だいに大きな凝集体を形成していくものと考えられる。そして凝集体形成の律速段階は, 「核」形成の段階にあり, PS含量の多い膜では充分大きくて安定な「核」ができやすく, PS含量の少ない膜では「核」ができにくいと考えられる。そのためPS含量の多い膜ほど凝集体形成は速くなるものと説明できる。

PS-PC膜でみられた相分離の著しいイオン選

振性の機構は次のように考えられる。先にも述べたように相分離が生じるためにはPS分子間に結合しなればならない。PS分子とニ価カチオンとの結合は主としてイオン結合であるので、イオンが分子間に結合するためには、ある程度の大きさのイオン半径をもたなければならぬ。なぜならPS分子間の極性基はその脂肪酸側鎖の大きさのため一定距離以上は近づけないと考えられる。 Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} のイオン半径はそれぞれ 0.65 \AA , 0.99 \AA , 1.13 \AA , 1.35 \AA であり、 Mg^{2+} が一番小さい。このため Mg^{2+} はPS分子間に結合することができず、相分離を引き起こせないと考えられる。また4-3)節の実験で示したように、 Sr^{2+} , Ba^{2+} は Ca^{2+} ほどPS二層膜を固くしない。このことは Sr^{2+} , Ba^{2+} はPS分子間に結合できてもその結合エネルギーは Ca^{2+} ほど大きくないためPS分子の脂肪酸側鎖の配列度を Ca^{2+} ほど密にしないと説明できる。そのため Sr^{2+} , Ba^{2+} がPS-PC膜のPS分子に結合しても、側鎖間のファンデルワールス力の増大によるエンタルピーの減少は Ca^{2+} が結合

した時ほど大きくはならず、その結果相分離の程度は小さいと考えられる。

5-2) 相分離現象の脂質二層膜の性質におよぼす影響および生体膜の機能への関与の可能性

今まで述べた Ca^{2+} による相分離現象は、脂質膜の性質に大きな影響をおよぼすと考えられる。例えば、固相の凝集体中の脂質分子の膜面内での拡散は、著しく減少しているたう。同様に凝集体中の脂質分子の二層膜の一方の単層膜からもう一方の単層膜への移行 (flip-flop) もおさえられると考えられる。凝集体中の脂肪酸側鎖の配列が密になつて、その部分のイオンの透過性を減少させていると考えられる。実際 PS によって張られた黒膜 (脂質二層膜) の電気抵抗の値は Ca^{2+} を加えることによって著しく増加することが知られている(33)。PS (または PA) を含む二層膜の一方の単層膜にのみ Ca^{2+} が作用した場合には、 Ca^{2+} が接する単層膜にのみ相分離が生じ、固相と液晶相が共存するが、もう一方の単層膜は液晶相のままである状態が生じ

る。このような場合には、各々の単相膜での脂質分子の脂肪酸側鎖の配列の密度に違いが生じ、その結果二層膜が不安定になると考えられる。PS分子からなる小胞状二層膜の透過性が、小胞の外側にのみ Ca^{2+} を加えると著しく増加すること(33)およびPS-PC膜からなる小胞状二層膜の融合が小胞の外側に Ca^{2+} を加えることによつて促進すること(34)が Papahadjopoulos によつて示されているが、このことは二層膜の不安定性に関連していると考えられる。

PS分子は、生体膜のリン脂質のうち10%から15%の割合を占め、生体膜のリン脂質二層膜部分も、 Ca^{2+} による相分離が生じると考えられる。 Ca^{2+} によるPS凝集体の形成は、脂質層だけでなく、膜中のタンパク質の膜面内での拡散や回転に影響をおよぼし、その機能を制御している可能性がある。McConnell および彼の共同研究者達は、固相から液晶相への転移温度の異なる二種類のPC分子からなる二成分膜が、それぞれの転移温度の間の温度で、固相と液

晶相に相分離していることを示し、かつ相分離が膜の横方向の圧縮率 (*lateral compressibility*) および拡張率 (*extensibility*) を増加させ、それが透過系酵素などの膜タンパク質の運動を促進するという仮説を出している (35, 36)。同様の議論が Ca^{2+} によつて生じる相分離現象の場合にもあてはまる。

最後に具体的な例として、神経膜の興奮現象に Ca^{2+} による相分離が関与している可能性について述べる。イカ巨大神経の興奮現象には、外液に Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} のいずれかがなくてはならないが、 Mg^{2+} はこれらのイオンの代用はできないことが知られている (34)。このイオン選択性は PS-PC 二成分膜系における相分離現象の場合と一致する。さらに Cook はイカ巨大神経膜の PS 分子の一部を酵素的にホスファチジルエタノールアミン (PE) にかえると神経膜の活動電位が小さくなり、その PE を再び PS にもとすと活動電位がもとにもどることを示した (37)。これらのことは、二価カチオンによる PS 凝集体の形成が

(49)

神経膜の興奮現象に関与している可能性を示唆し、興味深い。

参考文献

1. D. Chapman
Biological Membrane 2 91 Academic New York ('73)
2. P. Devaux and H. M. McConnell
J. Am Chem Soc. 94 4475 ('72)
3. R. D. Kornberg and H. M. McConnell
Biochemistry 10 1111 ('71)
4. E. Oldfield and D. Chapman.
Biochem. Biophys Res. Commun. 43 102 ('71)
5. M. Sinesky
Proc Nat Acad. Sci. U.S. 71 522 ('74)
6. B. D. Kruyff P.W.M. Van. Dijck R.E. Goldback R.A. Demel
and L.L.M. Van Deenen. Biochim Biophys Acta 330 269 ('73)
7. A.G. Lee, N.J. Birdsall, J.C. Metcalfe, P.A. Toon and G.B.
Warren Biochemistry 13 3699 ('74)
8. B.J. Winsorowski, J.G. Parkes Y.O. Hwang and C.F. Fox
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 71 4381 ('74)
9. C.J. Scandella, P. Devaux and H.M. McConnell
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 69 2056 ('72)

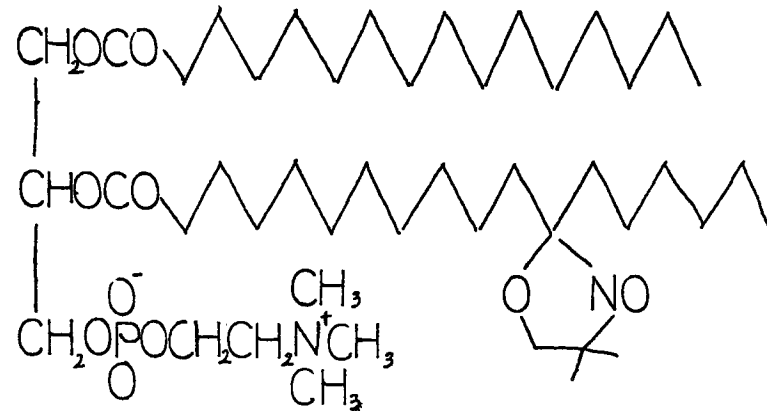
- 10 M. S. Bretscher
J Mol Biol. 71 523 ('72)
- 11 L. D. Frye and M. Edidin
J Cell Sci 7 319 ('70)
12. R. A. Cone
Nature New Biol. 236 39 ('72)
- 13 A W Cuthbert
Calcium and Cellular Function Macmillan London ('70)
14. W S Singleton, M.S. Gray, M.L. Brown and J.L. White
J Amer. Oil Chem. Soc. 42 53 ('65)
- 15 H. Sanders
Biochim Biophys Acta. 144 487 ('67)
16. R D. Kornberg and H M. McConnell.
Proc Nat Acad. Sci. U.S. 68 2564 ('71)
17. S F Yang
Methods Enzymol 14 206
- 18 W L. Hubbell and H M. McConnell
J Amer. Chem Soc. 93 314 ('71)
19. A S. Waggoner, T-J Kingzett, S Kottschaefer and O.H. Griffith
Chem Phys. Lipids 3 245 ('69)

- 20 P. Jost, L. J. Libertini, V. C. Hebert and O. H. Griffith
J. Mol. Biol. 59 47 (1971)
- 21 M. Ishinaga and M. Kito
Eur. J. Biochem. 42 483 (1974)
22. B. W. Agranoff and W. D. Suomi
Biochem. Prep. 10 47 (1963)
- 23 J. G. Moffatt and H. G. Khorana
J. Am. Chem. Soc. 83, 649 (1961)
- 24 S. Tokutomi and S. Ohnishi 私信
25. T. Seimiya and S. Ohki
Biochim. Biophys. Acta 298 546 (1973)
- 26 I. Tasaki
Nerve Excitation: A Macromolecular Approach, Charles
 C. Thomas Springfield (1968)
27. M. Rabinovitch and M. Destefano
J. Cell. Physiol. 85 189 (1975)
- 28 W. L. Hubbell and H. M. McConnell
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 61 12 (1968)
29. W. L. Hubbell, J. C. Metcalfe, S. M. Metcalfe and H. M. McConnell
Biochim. Biophys. Acta 219 415 (1970)

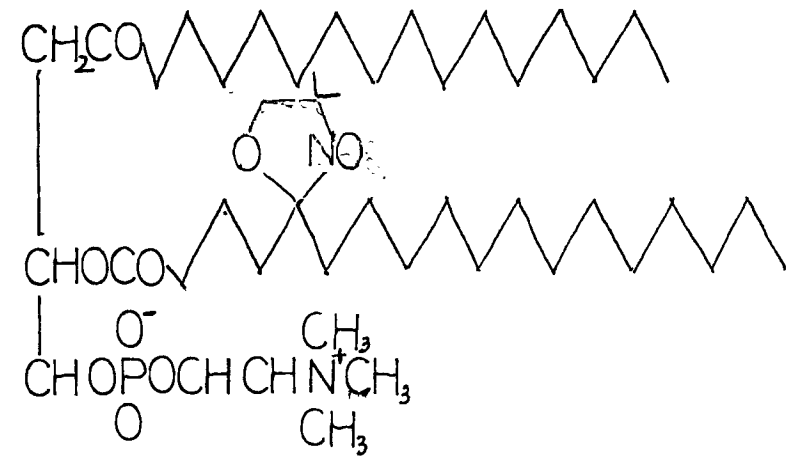
30. J R. Trudell, W. L. Hubbell and E. N. Cohen
Biochim Biophys Acta 291 321, 328 ('73)
31. K. W. Butler, H. Dugas, I. C. P. Smith and H. Schneider
Biochem Biophys Res Commun. 40 770 ('70)
32. M. B. Feinstein
J Gen Physiol. 48 357 ('64)
33. D. Papahadjopoulos and S. Ohki
Science 164 1075 ('69)
34. D. Papahadjopoulos and N. Miller
Biochim Biophys. Acta 135 624 ('67)
35. D. Papahadjopoulos, G. Poste, B. E. Schaeffer and W. J. Vail
Biochim Biophys Acta 352 10 ('74)
36. E. J. Shimechick and H. M. McConnell
Biochemistry 12 2351 ('73)
37. C. D. Linden, K. L. Wright, H. M. McConnell and C. F. Fox
Proc. Nat. Acad. Sci. U S 70 2271 ('73)
38. A. M. Cook, E. Low and M. Ishizima
Nature, New Biol 239 150 ('72)

図式) スピララベルした種々のリン脂質

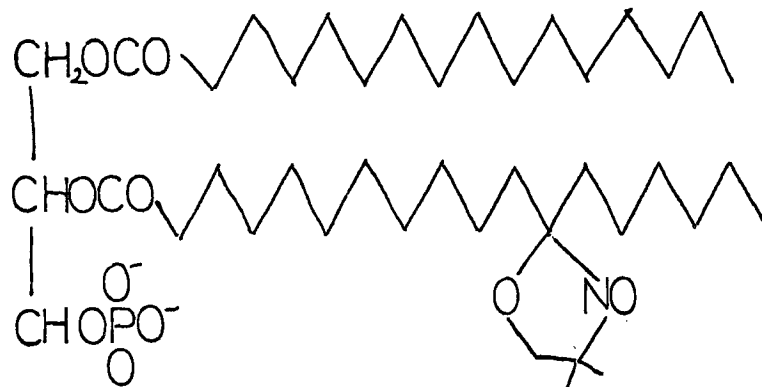
a) 12 PC*



b) 5 PC*



c) 12 PA*



d) 12 PS*

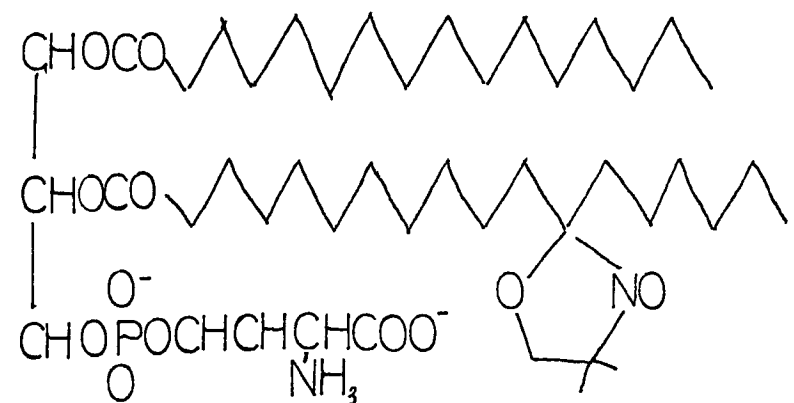


图 1) 12 PS* 合成方法

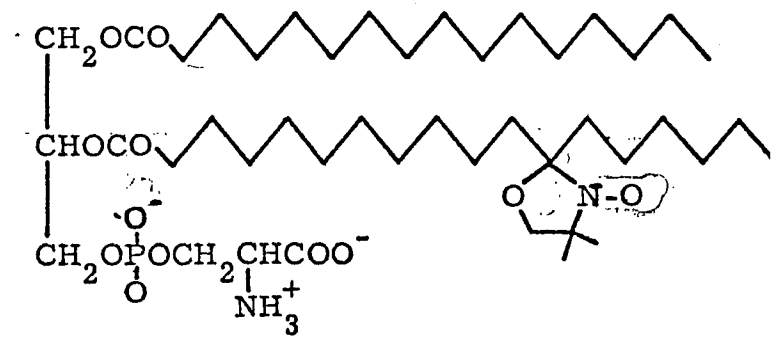
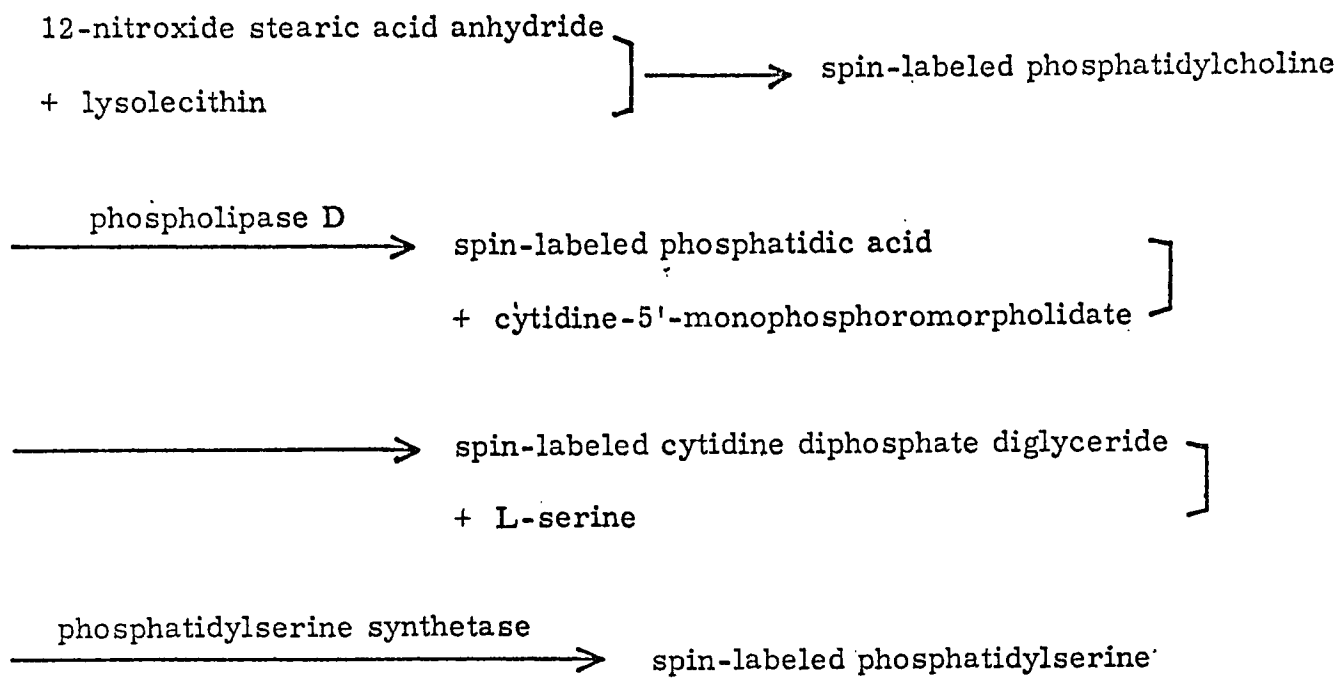


図 3) 異性回転する時の主軸系およびニトロキシドラジカルの分子内固定主軸系

(57)

(x', y', z') : 速い異性回転する場合の主軸系

(x, y, z) : ニトロキシドラジカルの分子内固定主軸系

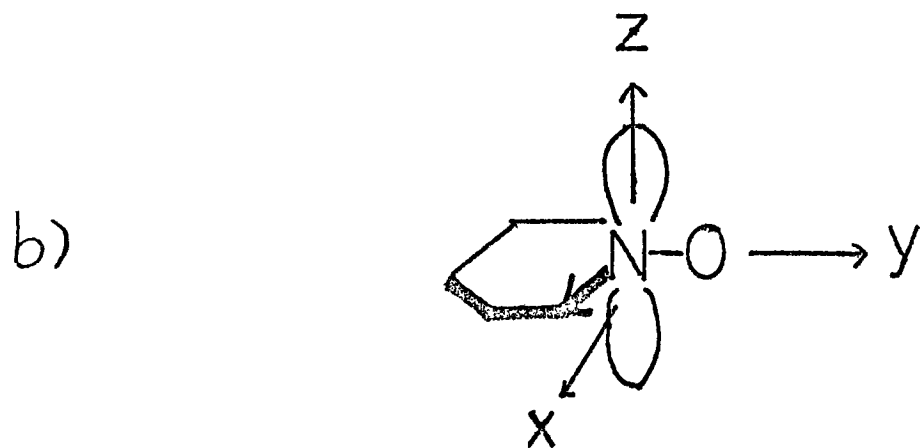
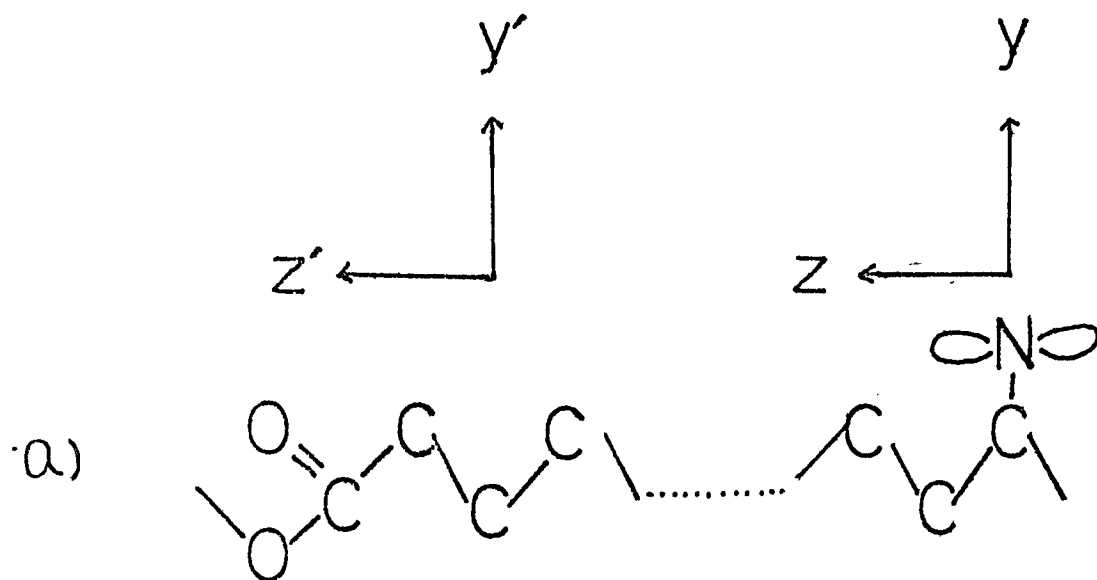


図 4) PS-12PS* (100:1) 膜の ESR スペクトル

a) pH 7.2 (100_mM KCl, 10_mM EDTA を含む 50_mM Tris-HCl 緩衝液で pH を調整)

b) { 実線 pH 2.1
 { 点線 pH 3.1 (100_mM KCl, 10_mM EDTA を含む 25_mM クエン酸-水酸化カリウムで pH を調整)

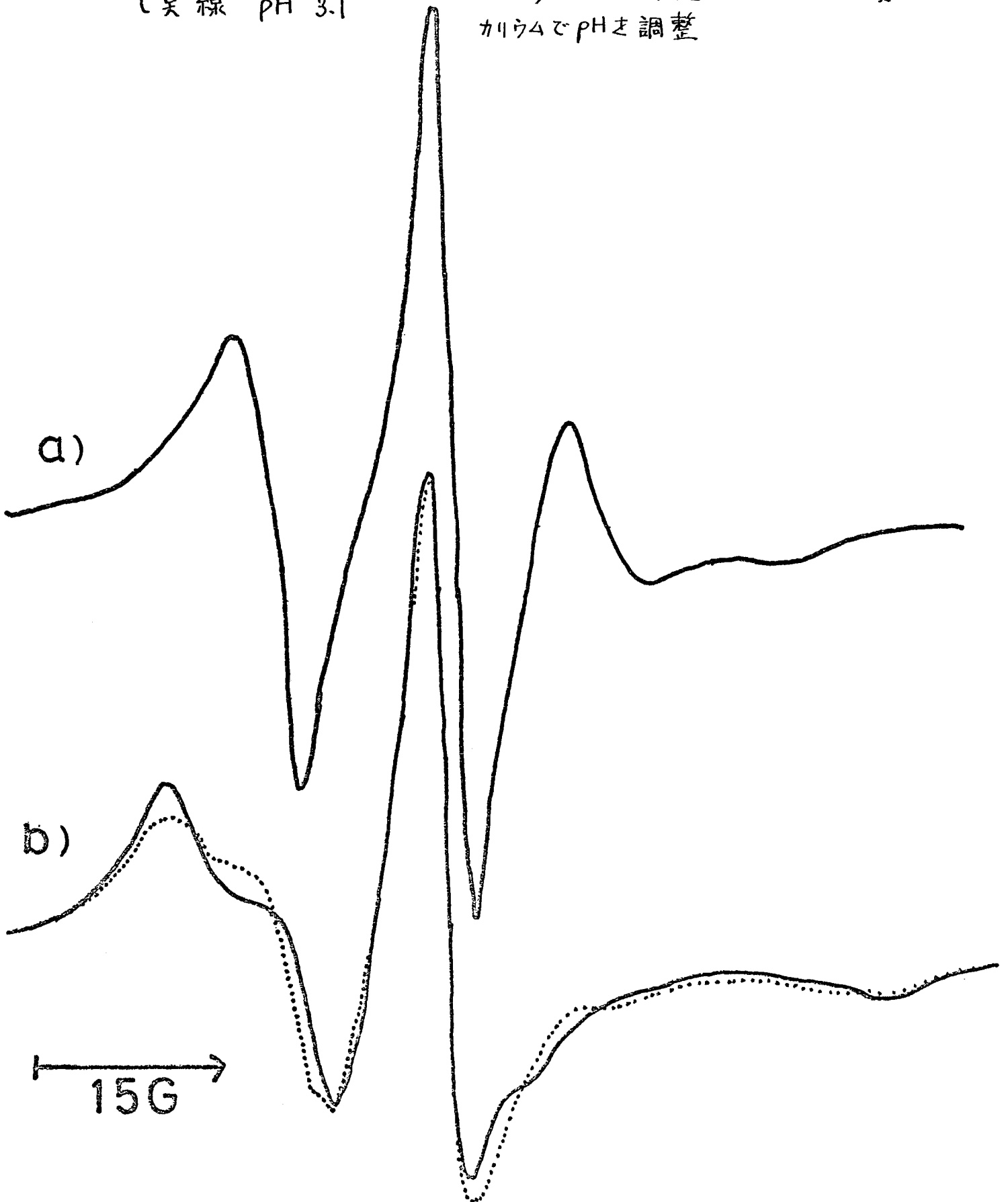


図 5) PS-12PS*(100:1)膜の固相スペクトル量のpH依存性 (59)

pH 4.0 以下は 100 mM KCl を含む 25 mM クエン酸 - 水酸化カリウムで,
pH 4.0 以上は 100 mM KCl を含む 25 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウムで pH を調整
ESR の測定は 23°C でおこなった。

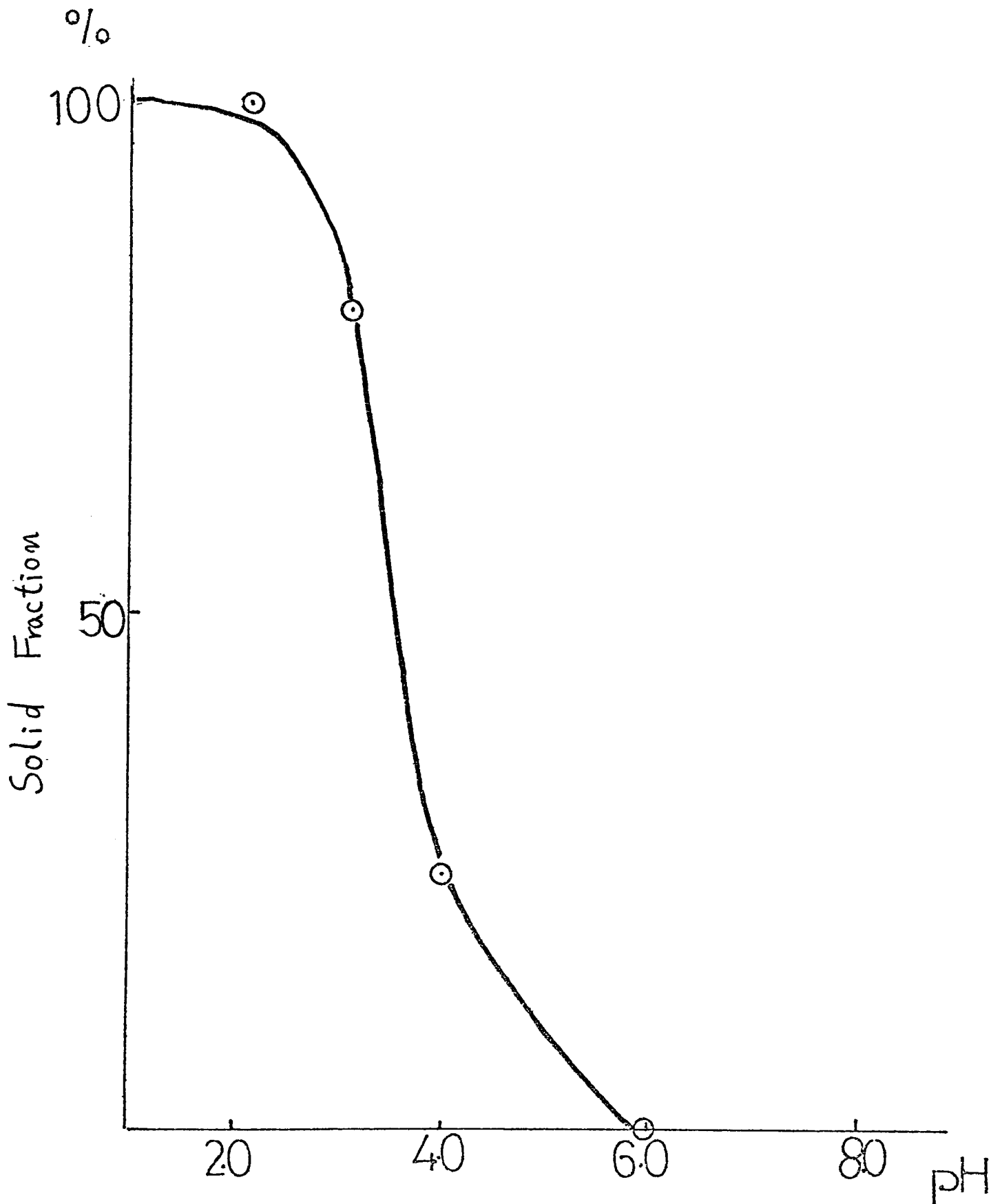


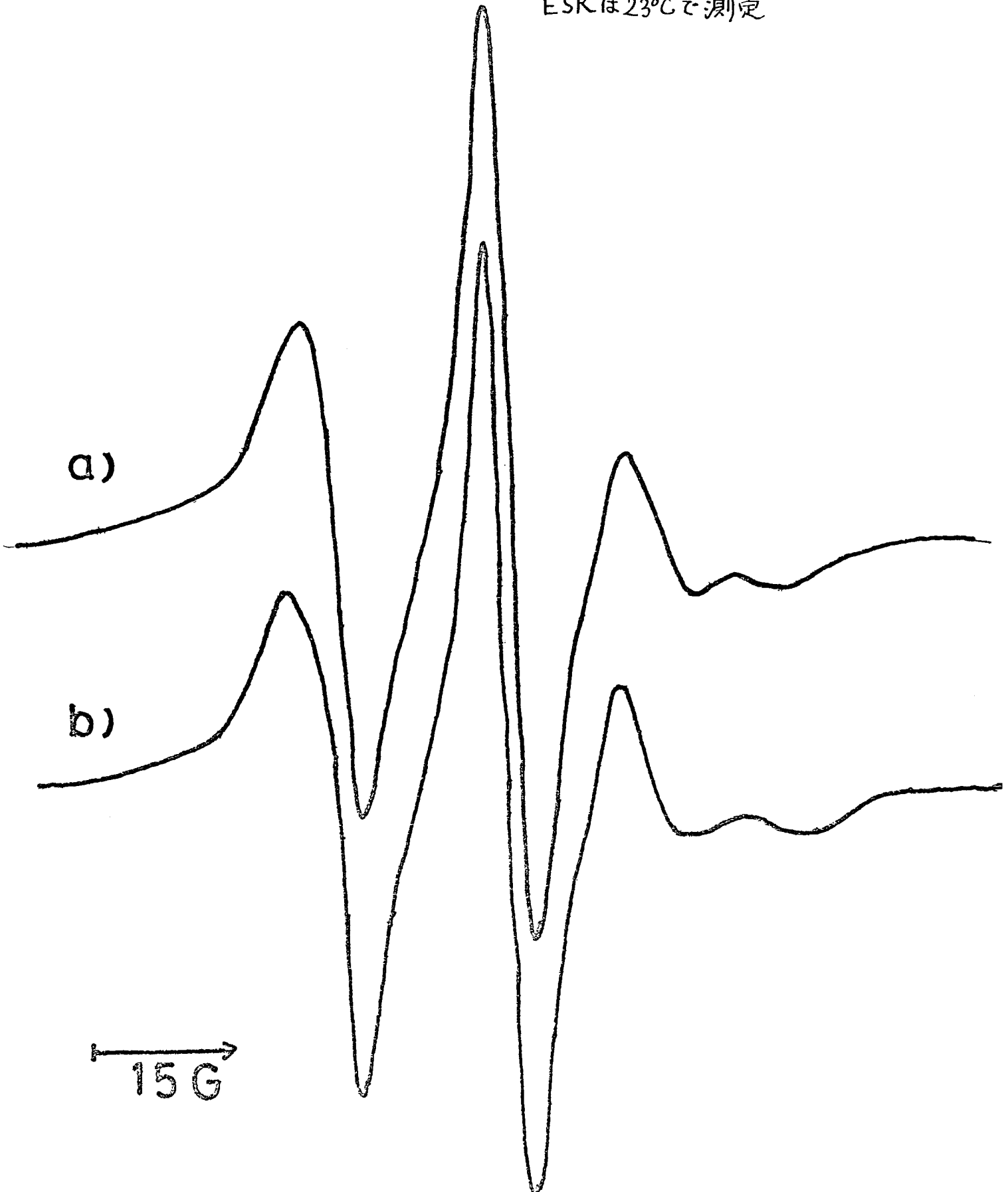
図 6) PA-12 PA* (100:1) 膜の ESR スペクトル

(60)

a) pH 7.9 100_mM KCl を含む 50_mM Tris-HCl 緩衝液で pH を調整

b) pH 5.6 100_mM KCl を含む 50_mM 酢酸-酢酸ナトリウムで pH を調整

ESR は 23°C で測定



a) Mg^{2+}

b) Sr^{2+}

c) Ba^{2+}

d) Ca^{2+}

溶液は 10mM MCl_2 , 100mM KCl を含む pH 7.2 の

50mM Tris-HCl 緩衝液を用いる。ただし M は 2 価カチオンを示す。

ESR は 23°C で測定

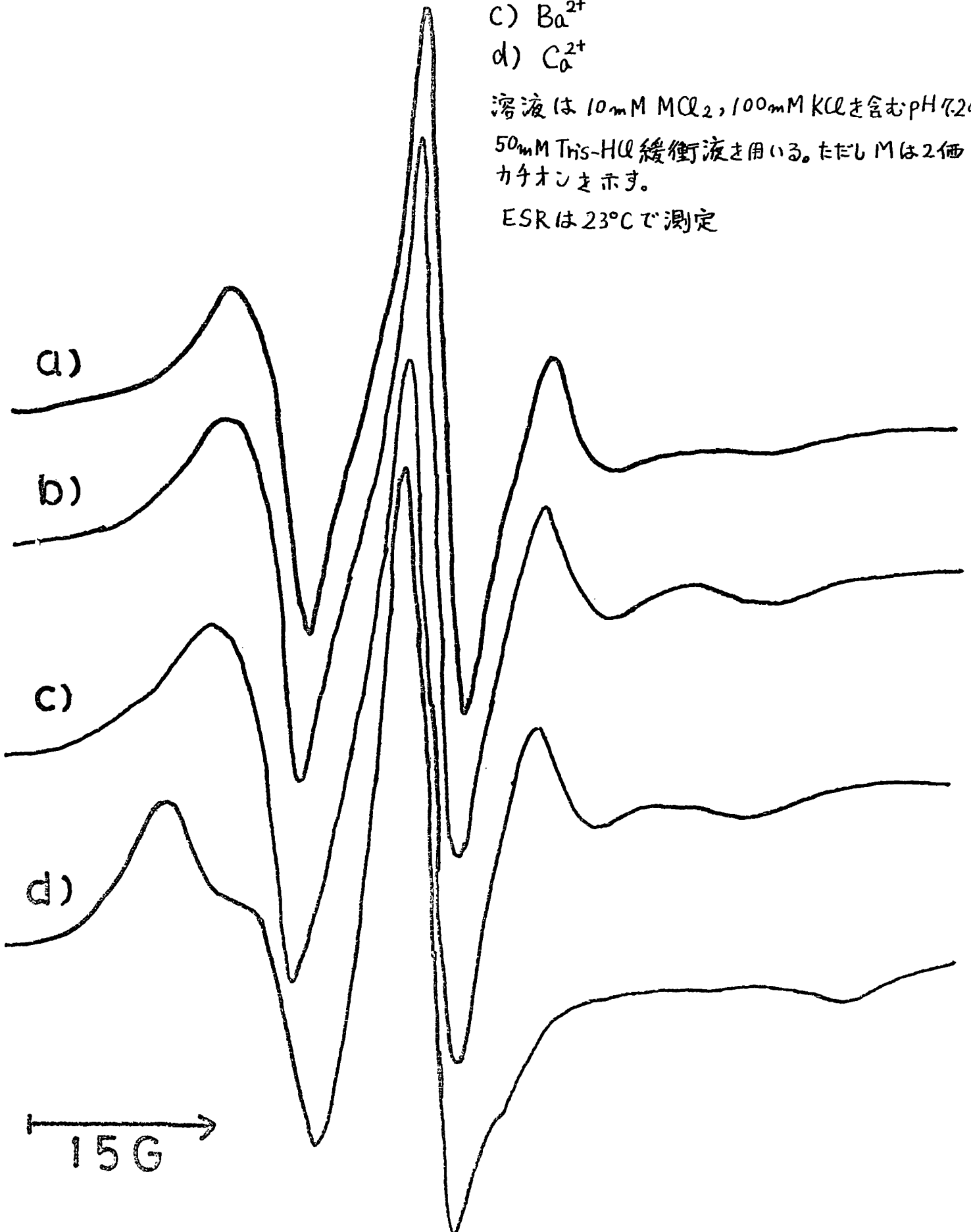
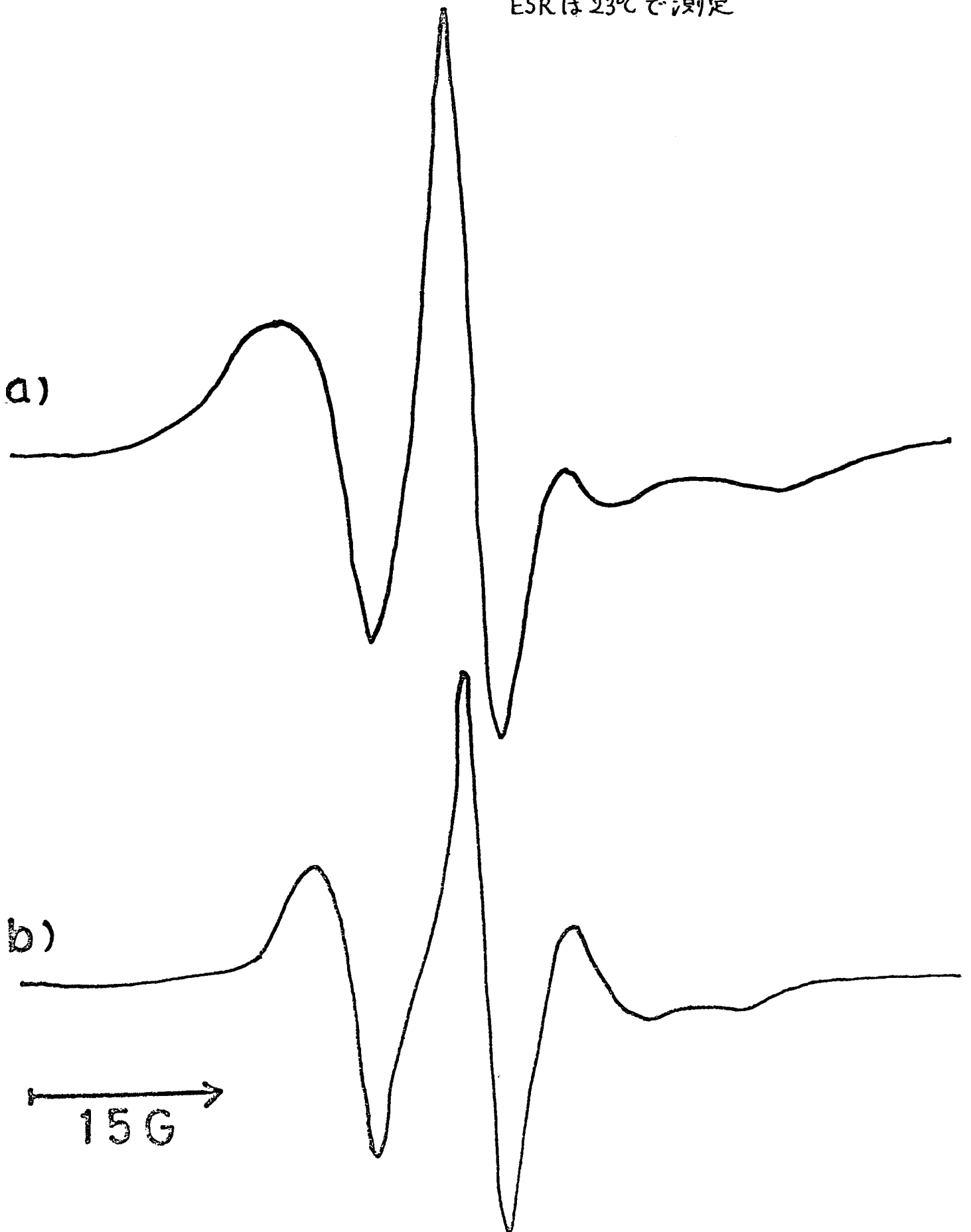


図 8) PA-12PA*(100:1) 膜に対する Ca^{2+} , Mg^{2+} の効果

a) Ca^{2+} b) Mg^{2+}

溶液は 50mM $MgCl_2$, 100mM KCl を含む pH 7.9 の 50mM Tris-HCl 緩衝液を用いた。但し M は 2価カチオンを示す。

ESR は 23°C で測定



a) 100mM KCl 溶液中の ESR スペクトル

b) 100mM KCl-10mM CaCl_2 溶液中の ESR スペクトル

ESR は 23°C で測定

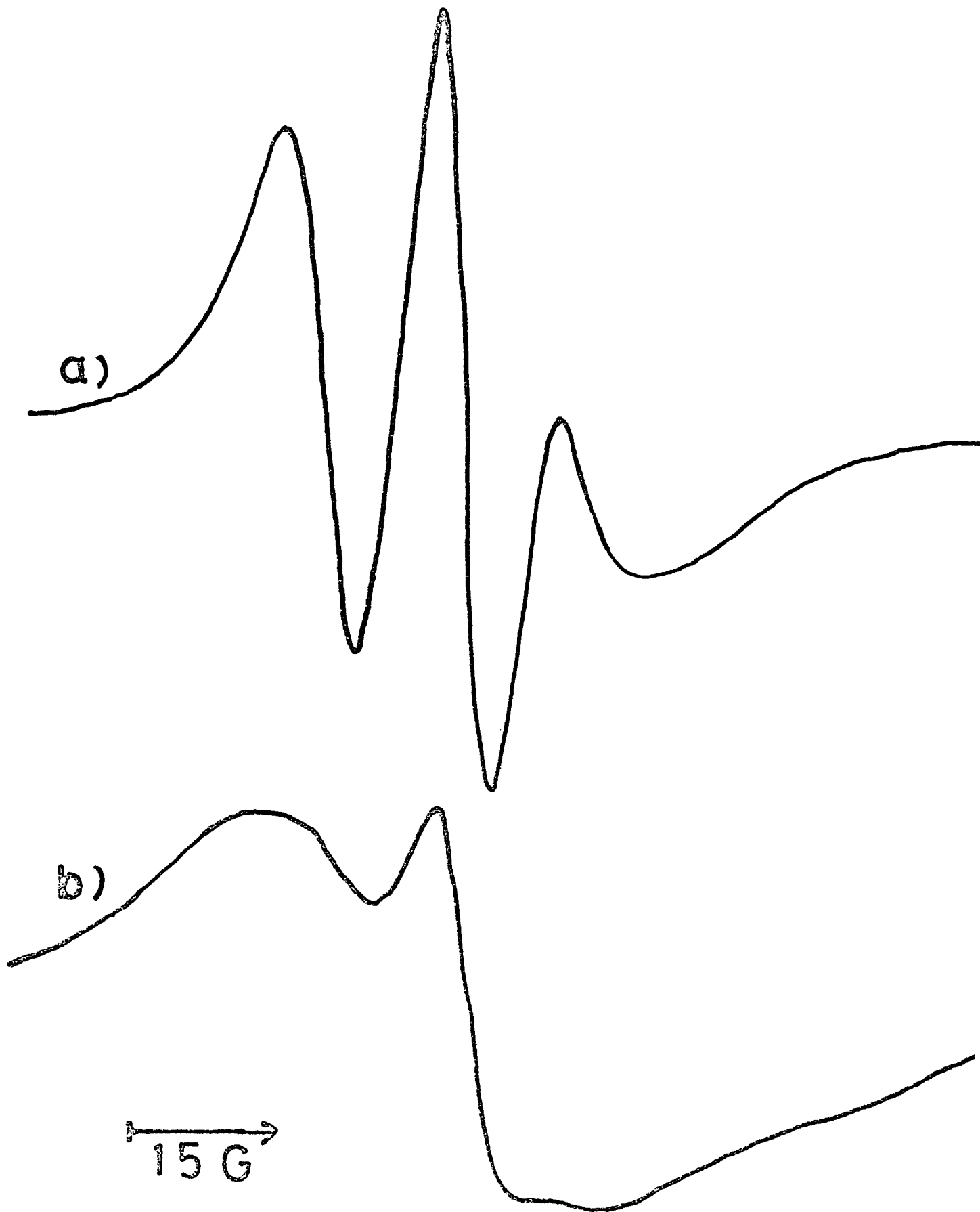
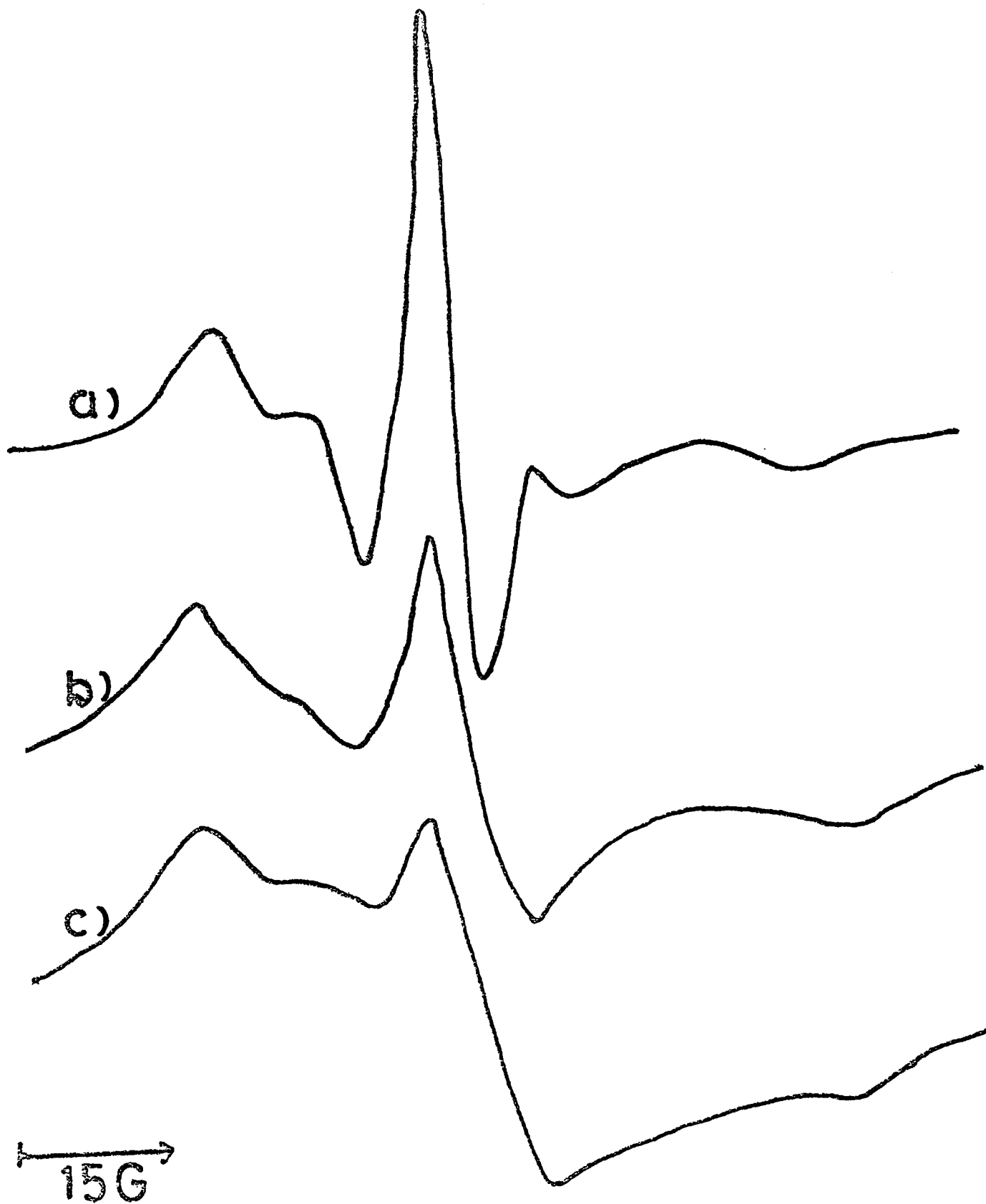


図10) PS-PC-5PC* (180:X:Y)膜に対するCa²⁺の効果

(64)

X:Y = a) 19:1 b) 10:10 c) 0:20

100_mM KCl, 50_mM CaCl₂を含む溶液中の
ESRスペクトル 測定温度は23℃



a) 100 mM KCl 溶液中

b) 100 mM KCl - 10 mM CaCl_2 溶液中

それぞれの溶液は 50 mM Tris-HCl 緩衝液で pH 7.9 (=する)。 ESR の測定温度は 23°C

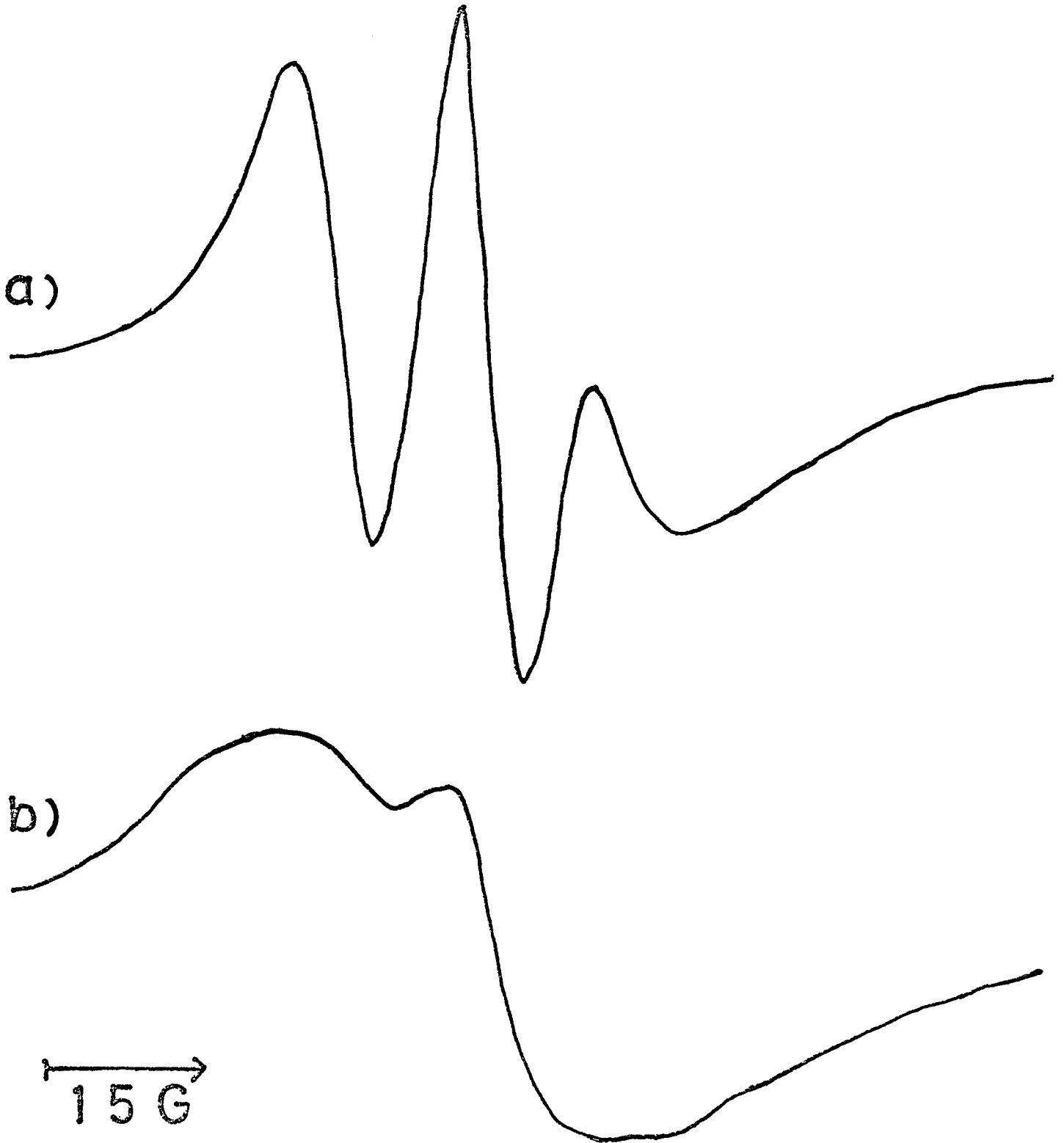


図 12) 12PC*含量の異なる PS-12PC*膜の Ca^{2+} 溶液中の
ESR スペクトル

(66)

a) PS-12PC* (9:1) 膜

b) PS-12PC* (50:1) 膜

100 mM KCl および 10 mM CaCl_2 を含む溶液中の ESR
スペクトル 測定温度は 23°C

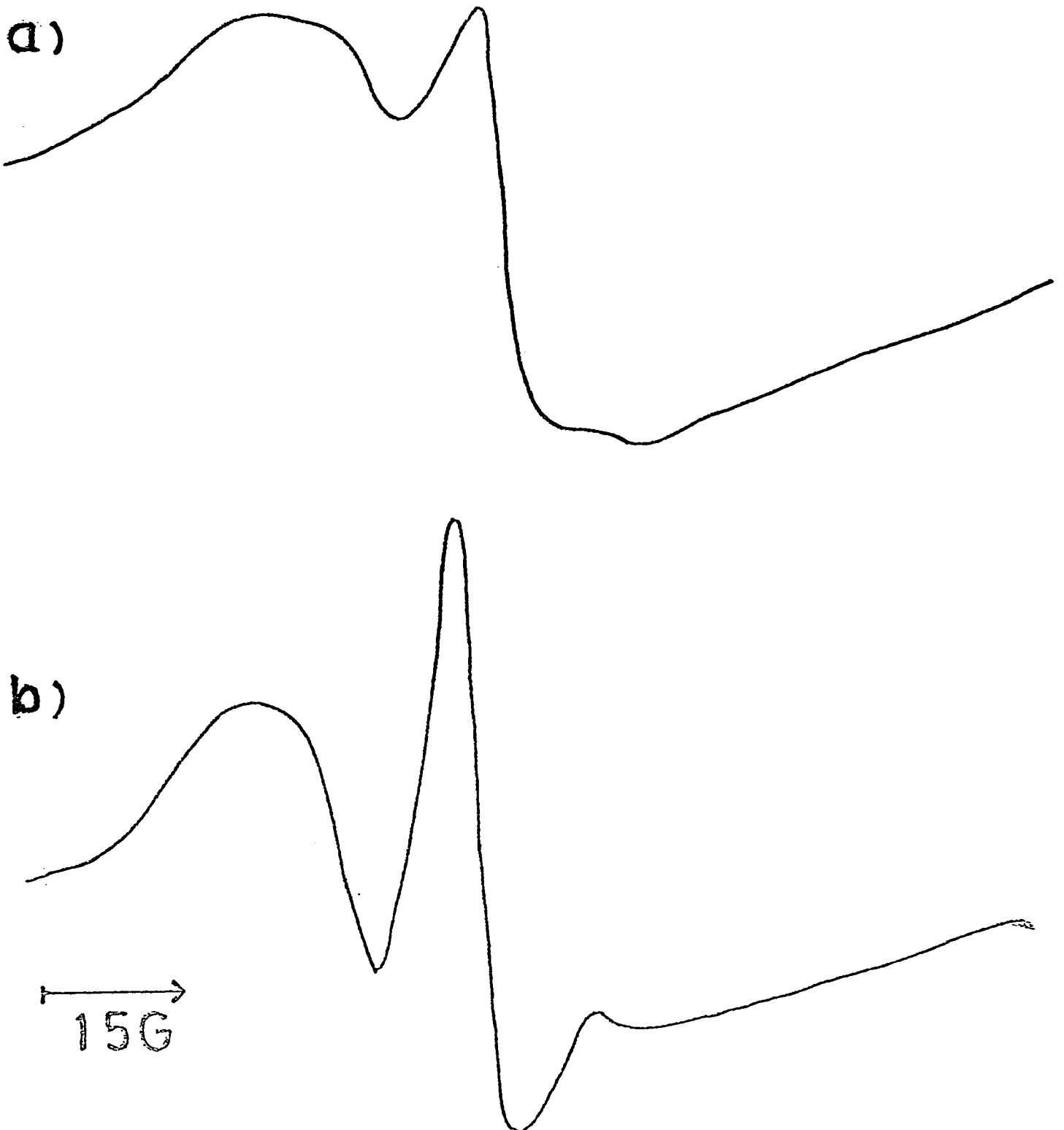


図 13) 一様な分子間 スピン-スピン相互作用をもつ場合の ESR スペクトル (67)

PC-12PC* (x:y) 膜を 100mM KCl 溶液中で
測定。測定温度は 23°C

(x:y) = a) (100:1)

b) (9:1)

c) (4:1)

d) (0:1)

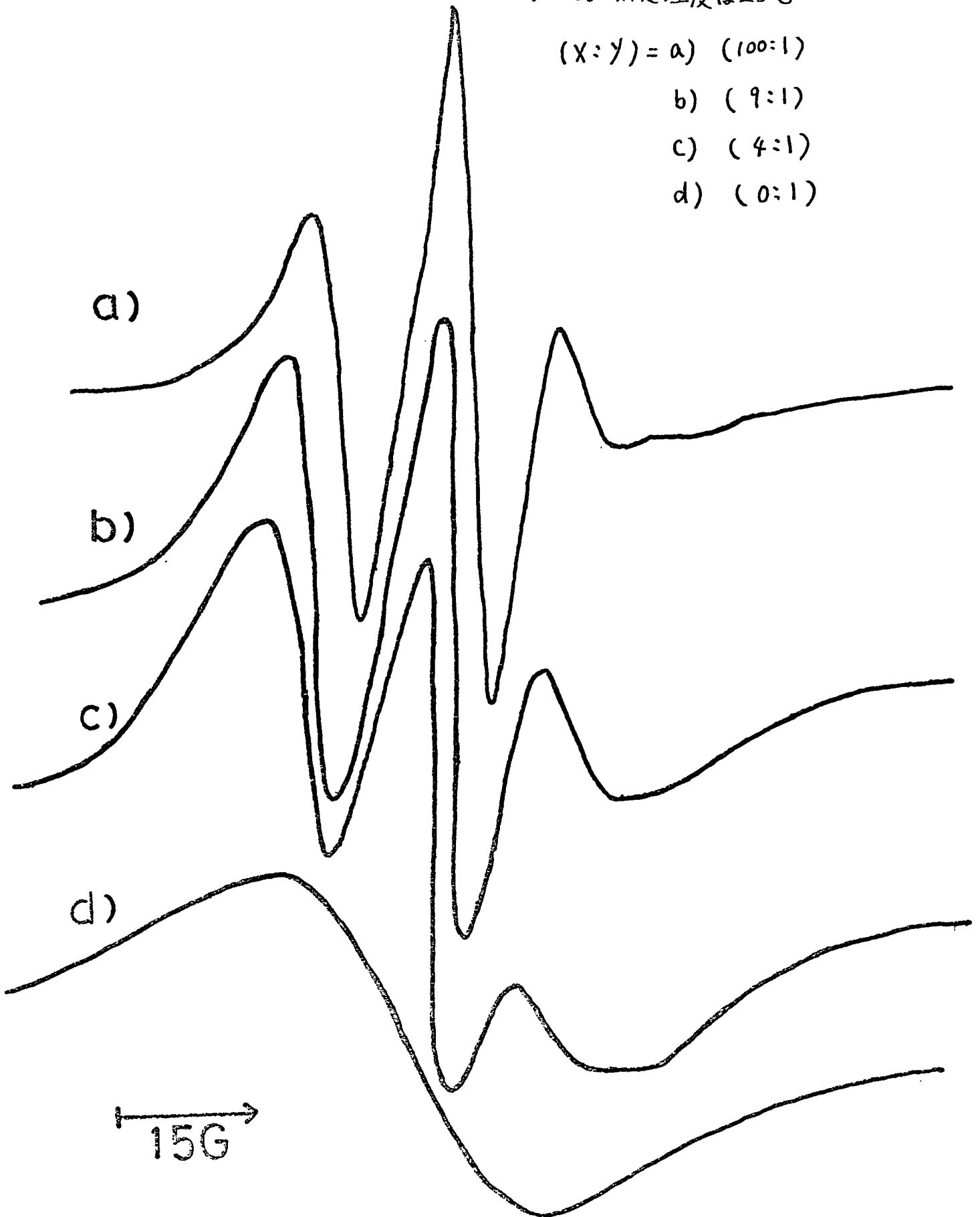


図 14) PS-12PC*(50:1)膜の Ca^{2+} 濃度依存性

100_{mM} KCl 溶液から 100_{mM} KCl - X_{mM} CaCl₂ 溶液に移して 10 分後の ESR スペクトル

X = a) 0 b) 0.5 c) 1.0 d) 10

それぞれの溶液は 50_{mM} Tris-HCl 緩衝液で pH 7.2 に調整。測定温度は 23°C

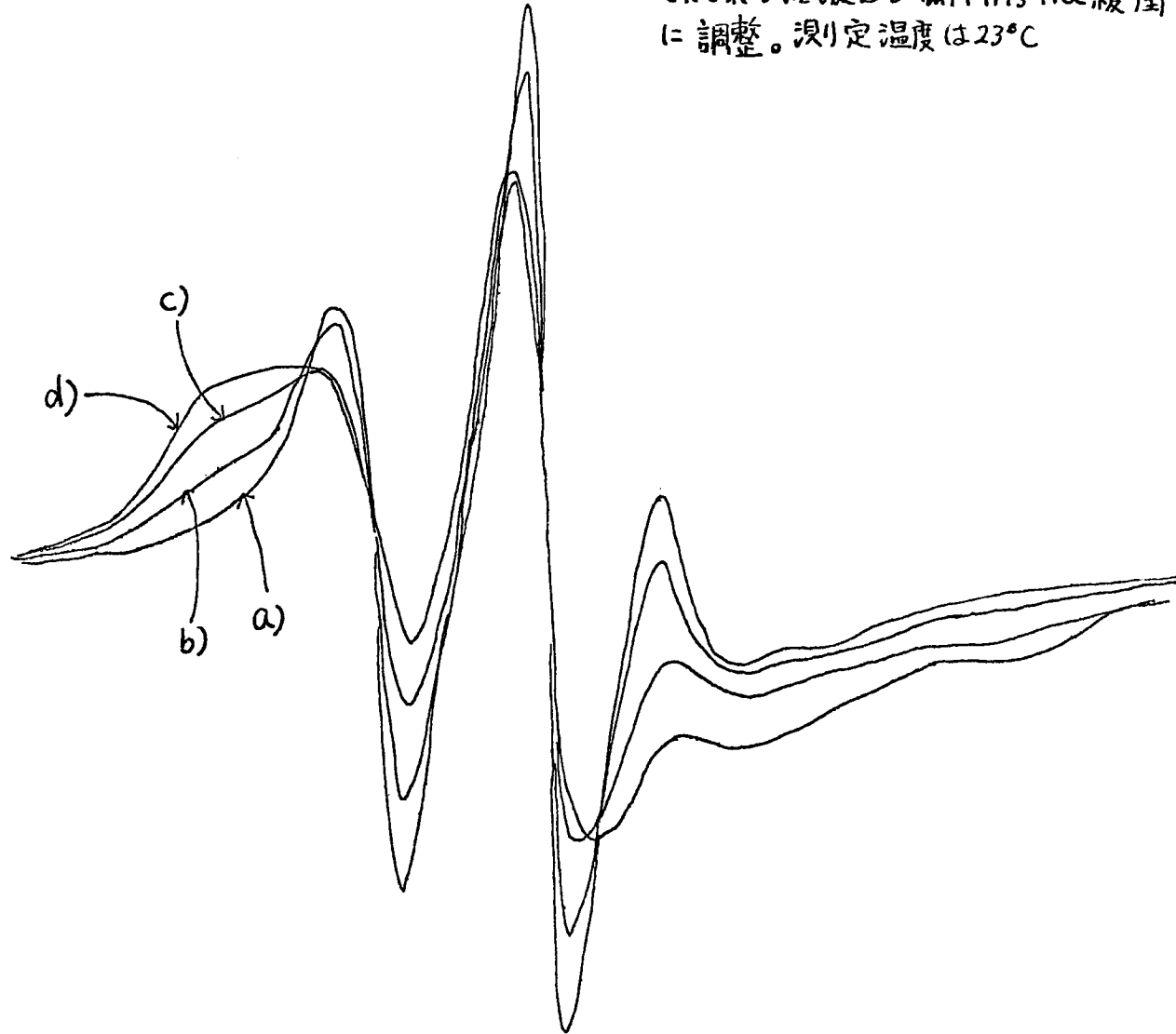


図 15) PS-12PC* (50:1) 膜の Ca^{2+} 濃度依存性

(69)

最低磁場のピークの半値幅 $\Delta H_{1/2}$ を求め、線幅のパラメータとする。(本文参照)

100 mM KCl から 100 mM KCl - X mM CaCl_2 溶液に移して

○ 10分後 △ 4時間後 □ 18時間後にそれぞれ測定

溶液は 50 mM Tris-HCl 緩衝液で pH 7.2 に調整 測定温度は 23°C

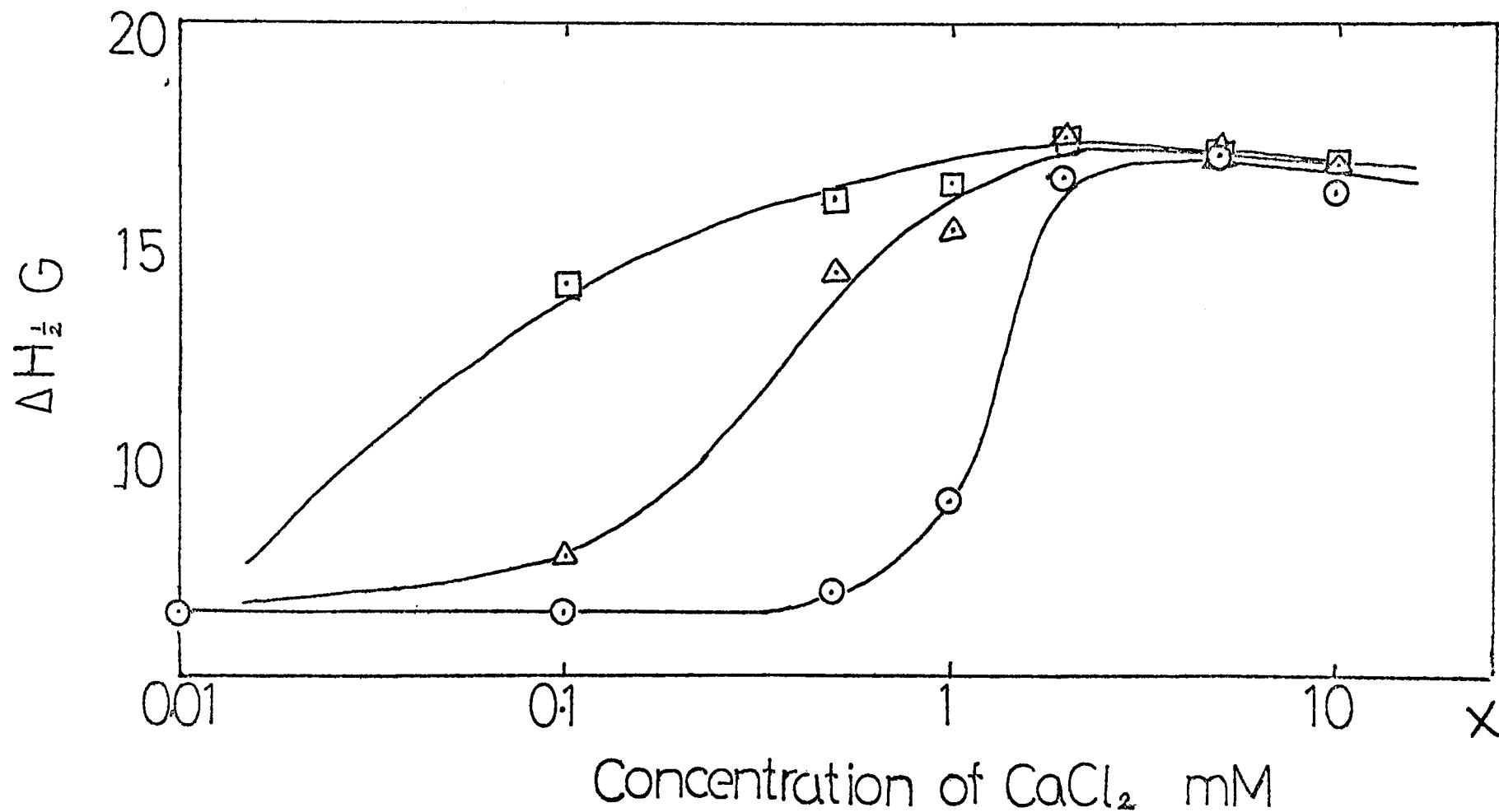


図 16) PS-12PC* (9:1) 膜に対する 2価カチオンの効果

(70)

- a) 50 mM $MgCl_2$
- b) 50 mM $SrCl_2$
- c) 50 mM $BaCl_2$
- d) 10 mM $CaCl_2$

それぞれの溶液は上記の塩と 100 mM KCl を含む
50 mM Tris-HCl 緩衝液で pH 7.2 に調整してある。

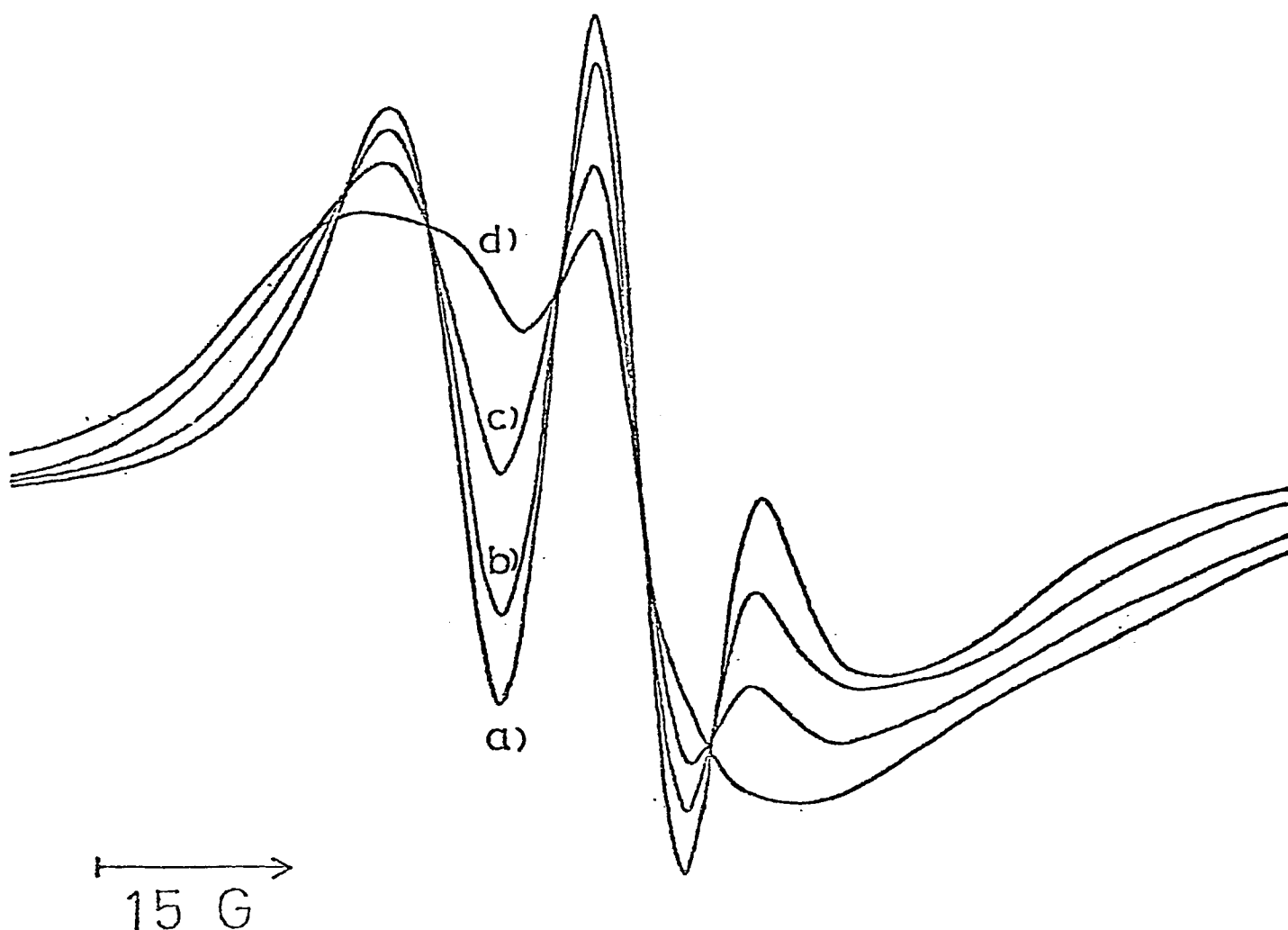


図 18) PA-12PC* (7:1) 膜に対する Ca^{2+} 以外の 2 価カチオンの効果

(72)

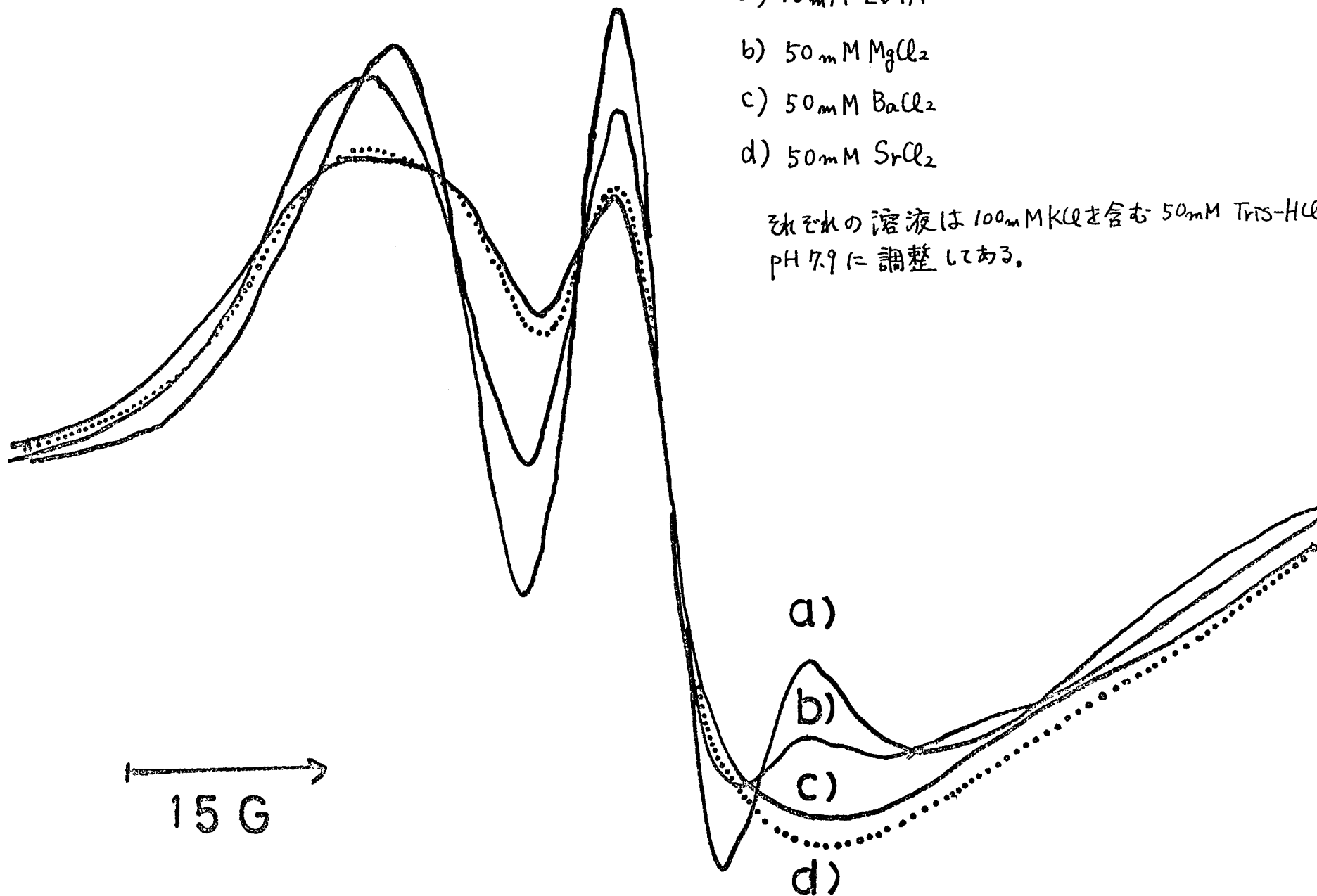
a) 10 mM EDTA

b) 50 mM MgCl_2

c) 50 mM BaCl_2

d) 50 mM SrCl_2

それぞれの溶液は 100 mM KCl を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液で
pH 7.9 に調整してある。



X = a) 0 b) 20 c) 33 d) 50 e) 67

それぞれ 100mMKCl, 10mM CaCl₂ を含む pH 7.2 の
50mM Tris-HCl 緩衝液中で ESR を測定
測定温度は 23°C

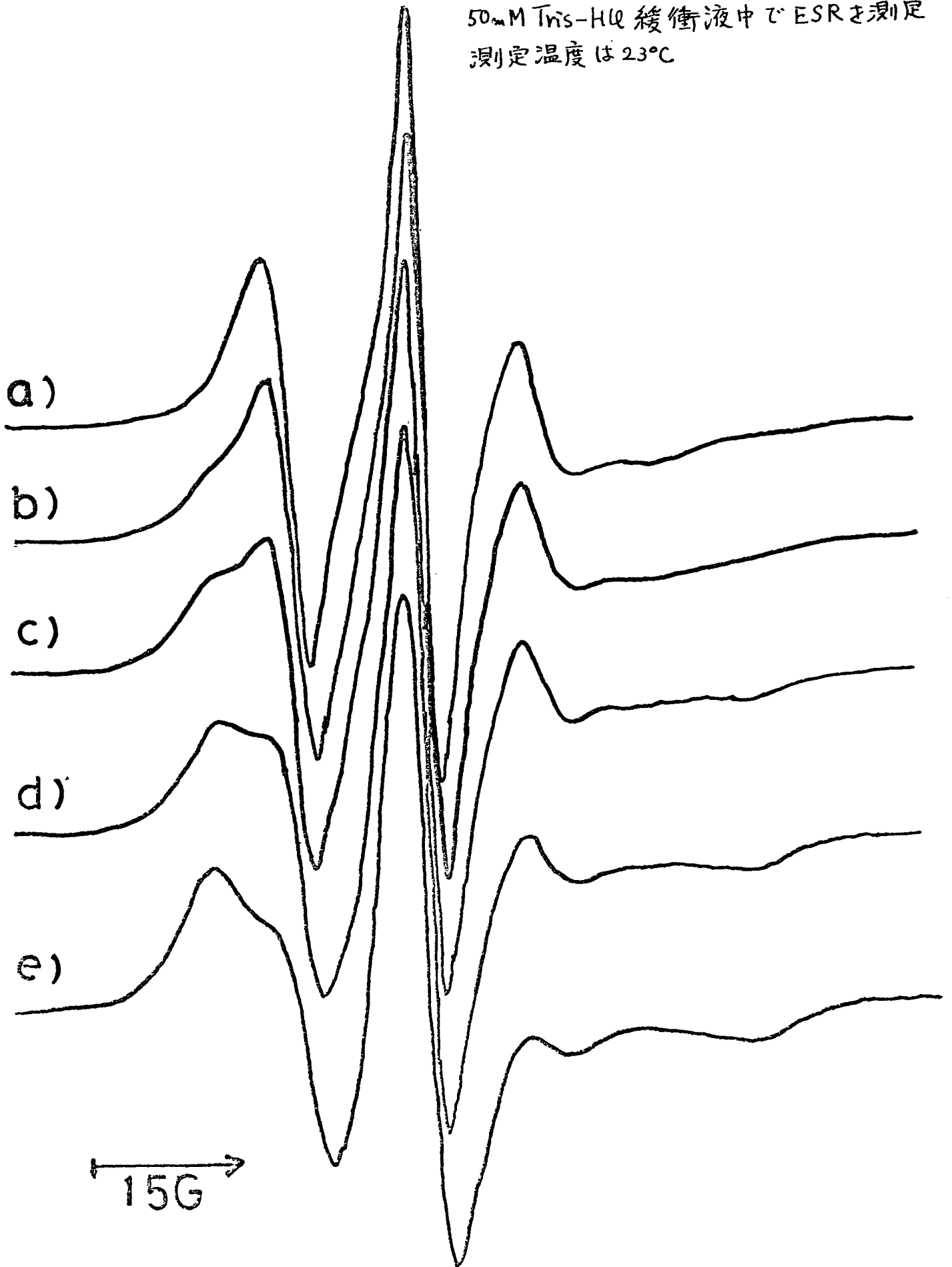


図 20) PS-12PS*-PC (X:0.5:100-X) 膜の Ca^{2+} 溶液中の固相量

(74)

a) PS 分子中の固相状態の PS のモル分率

b) 全リン脂質中の固相状態の PS のモル分率

23°C (○) および 40°C (△) の 100_{mM} KCl, 10_{mM} $CaCl_2$ を含む pH 7.2 の 50_{mM} Tris-HCl 緩衝液に 24 時間浸した後 ESR を測定 測定温度は 23°C.

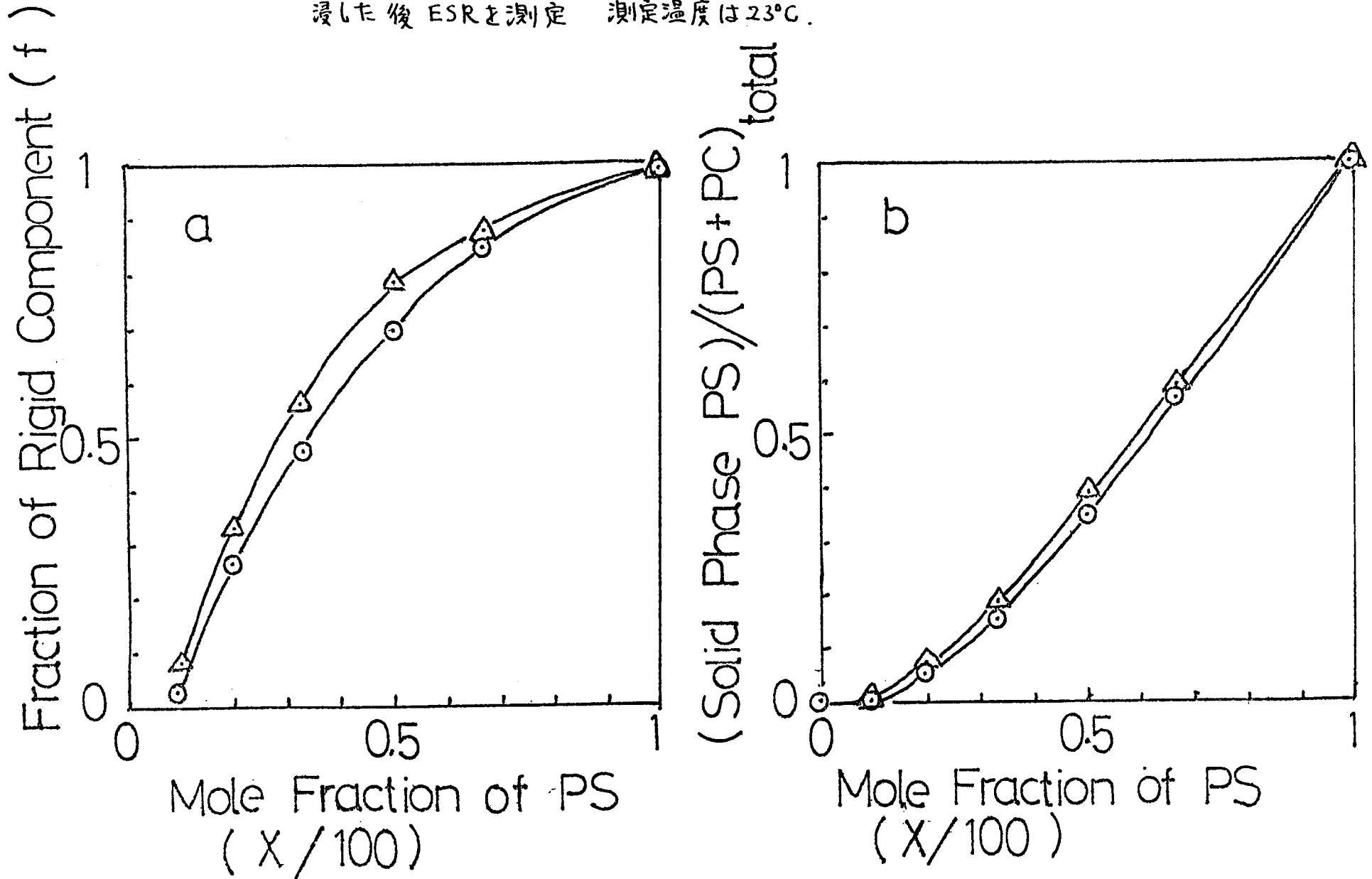


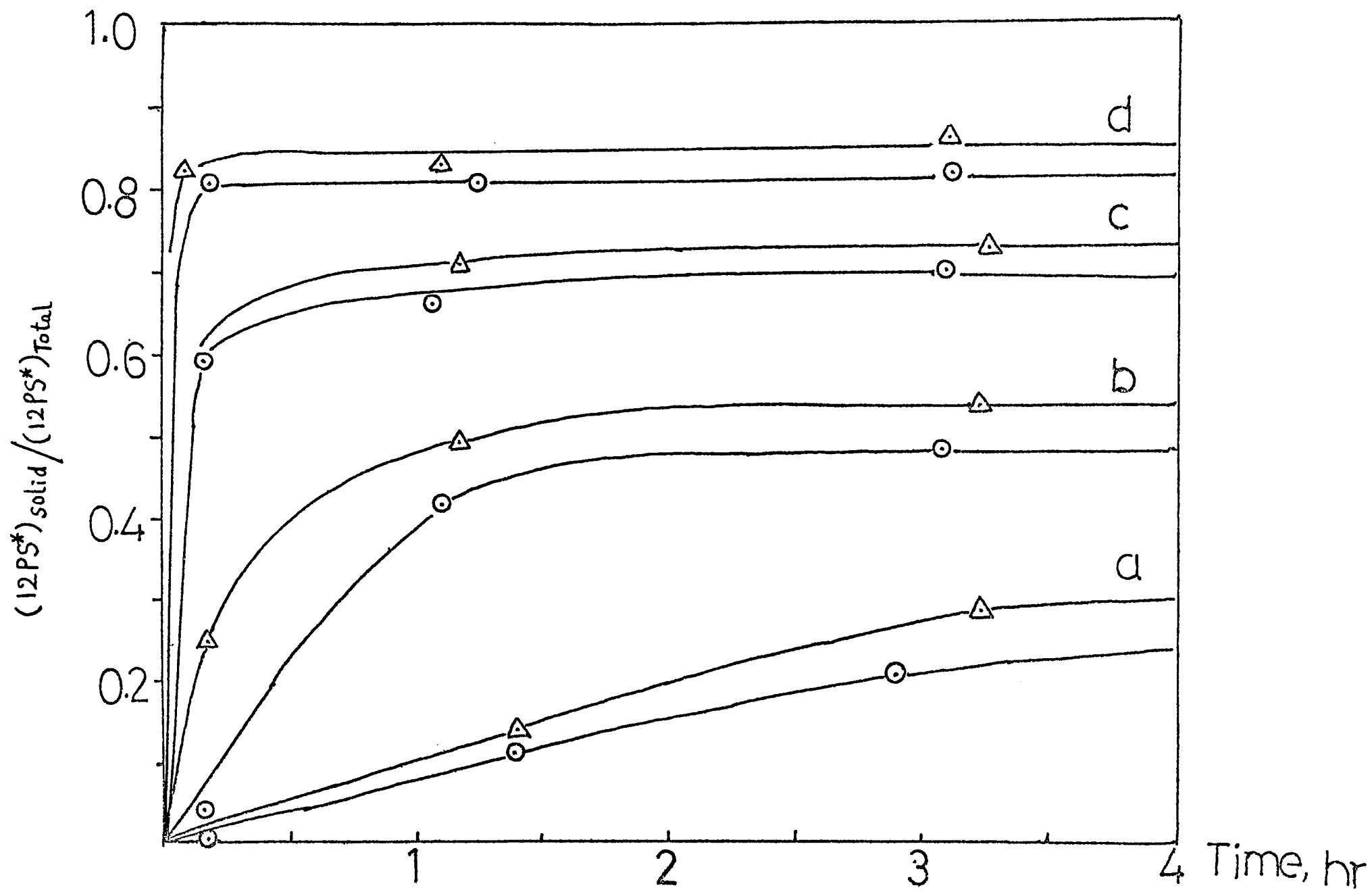
図 21) PS-12PS*-PC (X:0.5:100-X) 膜における Ca^{2+} による PS 凝集体形成速度

(75)

X = a) 20 b) 33 c) 50 d) 67

○ 23°C
△ 40°C

溶液は 100mMKCl, 10mM CaCl_2 を含む pH7.2 の 50mM Tris-HCl 緩衝液を用いる。



a) 12 PA* - PC (1:9) 膜 b) 12 PA* - PC (1:4) 膜

点線は 100 mM KCl, 10 mM EDTA を含む pH 8.0 の 50 mM Tris-HCl 緩衝液中の,
実線は 100 mM KCl, 10 mM $CaCl_2$ を含む pH 8.0 の 50 mM Tris-HCl 緩衝液中の
ESR スペクトル

測定温度は 23°C

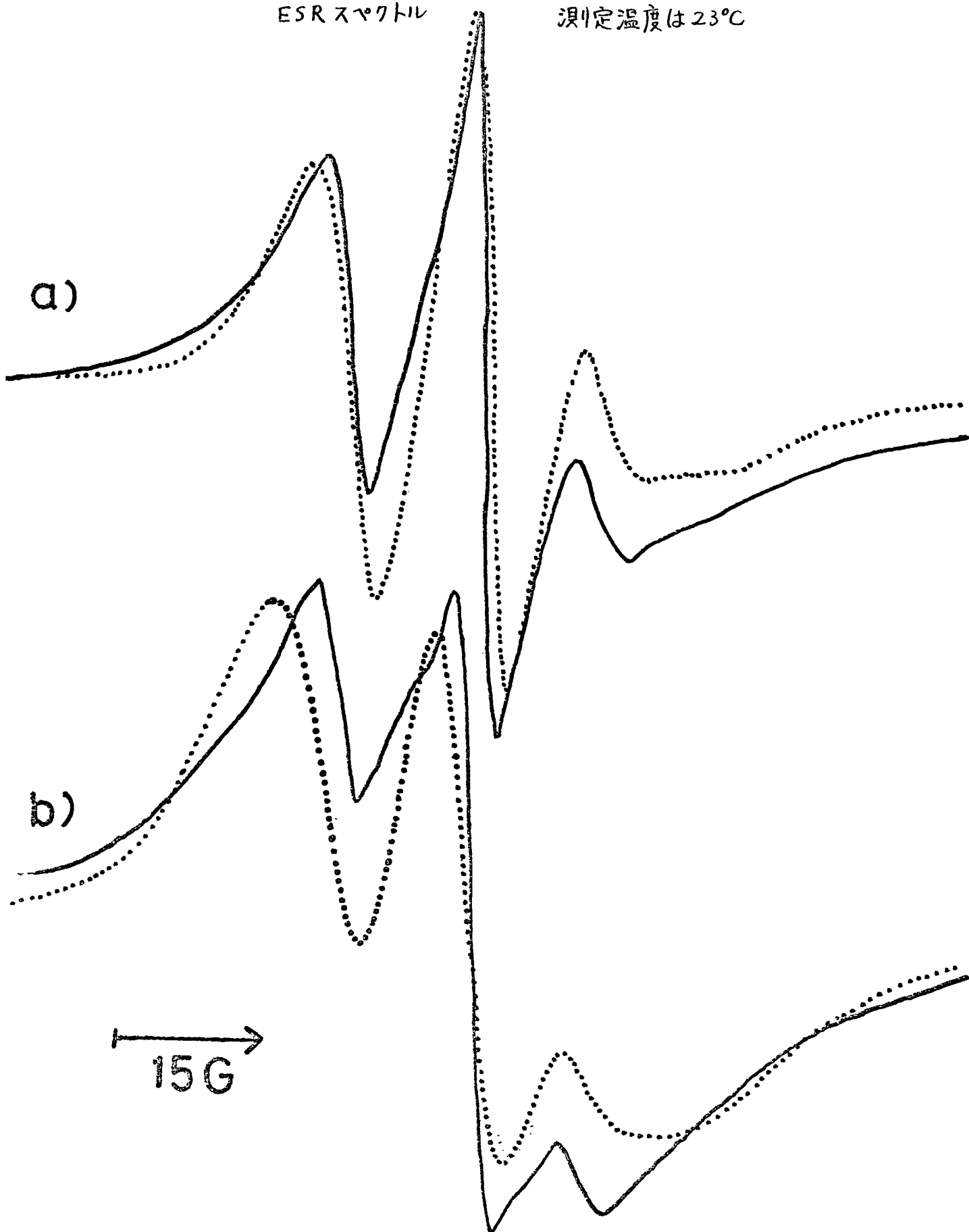


図23) M_g^* による 12-PA* 凝集体のスペクトルのシミュレーション

a) 12PA* - PC (1:9) 膜

b) 12PA* - PC (1:4) 膜

c) 12PA* - PC (1:50) 膜の 100mMKCl 溶液中の ESR スペクトル

本文参照

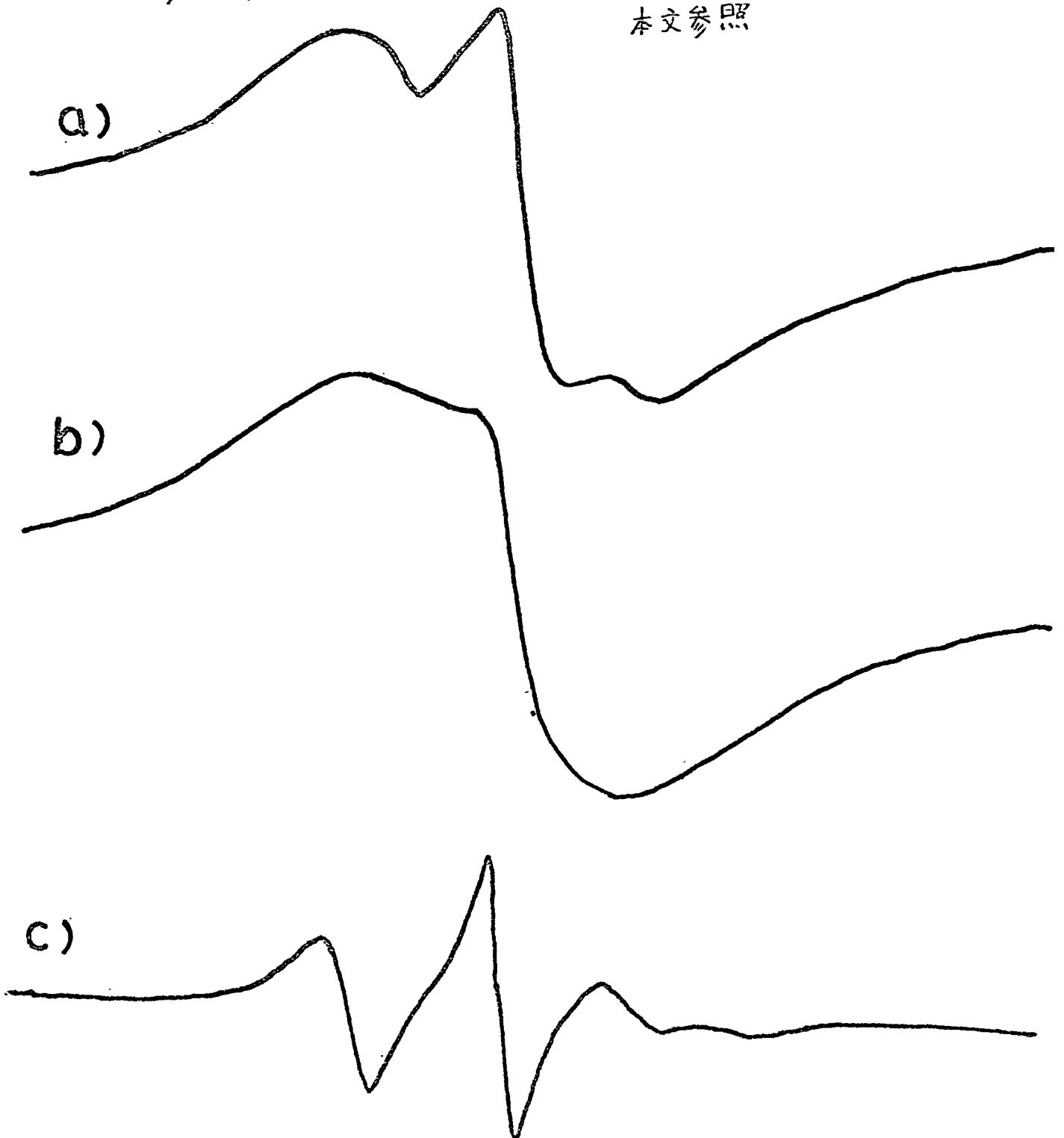


図 24) PS-12PC* (50:1) 膜における Ca^{2+} 効果に対する Mg^{2+} の影響 (78)

a) の実線および b) は 100mM KCl 溶液から $100\text{mM KCl}-10\text{mM CaCl}_2-50\text{mM MgCl}$ 溶液に切り替えて 10 分後 (a) の実線) 1 時間後 (b) の ESR スペクトル
a) の点線は $100\text{mM KCl}-10\text{mM CaCl}_2$ に浸して 10 分後の ESR スペクトル
それぞれの溶液は 50mM Tris-HCl 緩衝液で $\text{pH } 7.3$ にしてある。
ESR は 23°C で測定

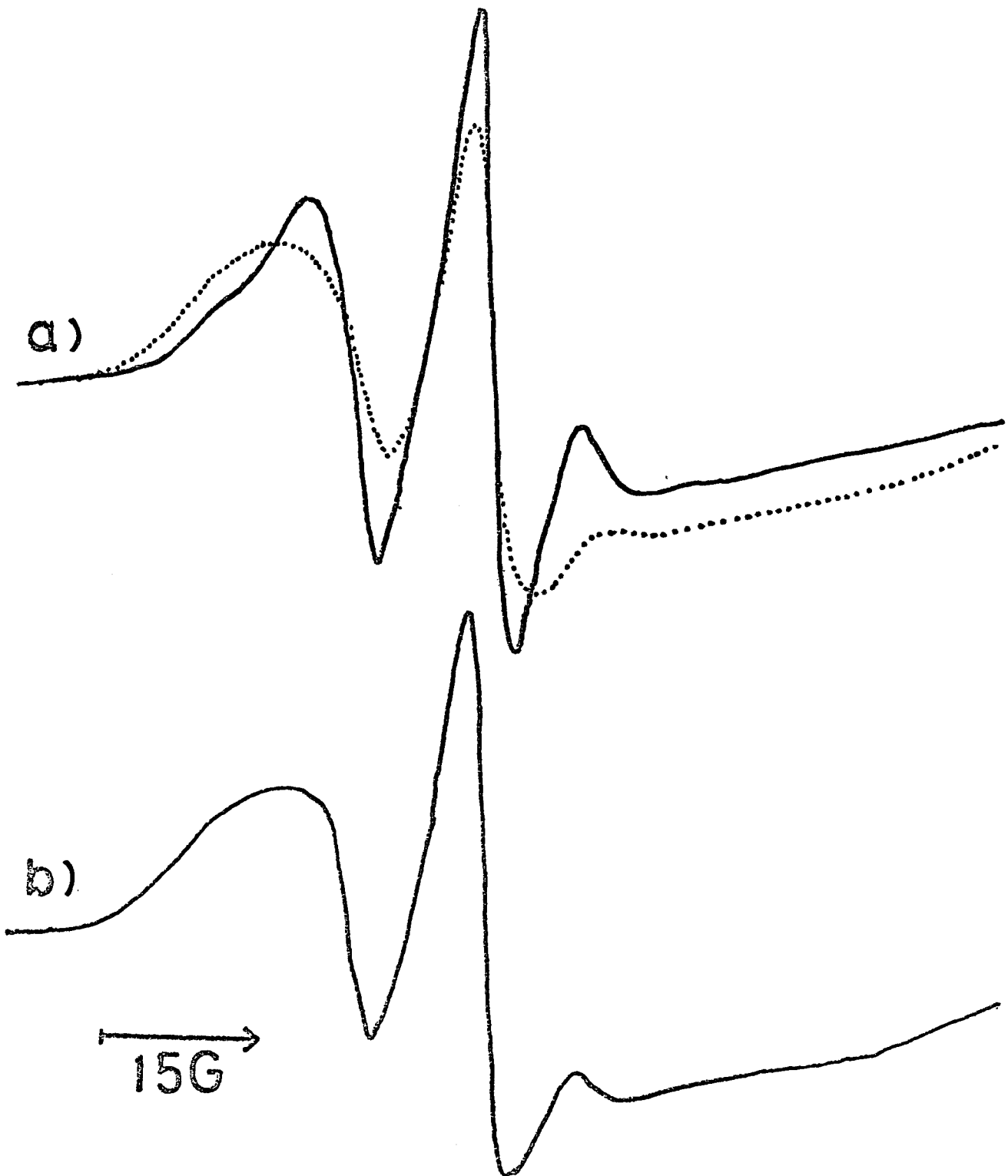
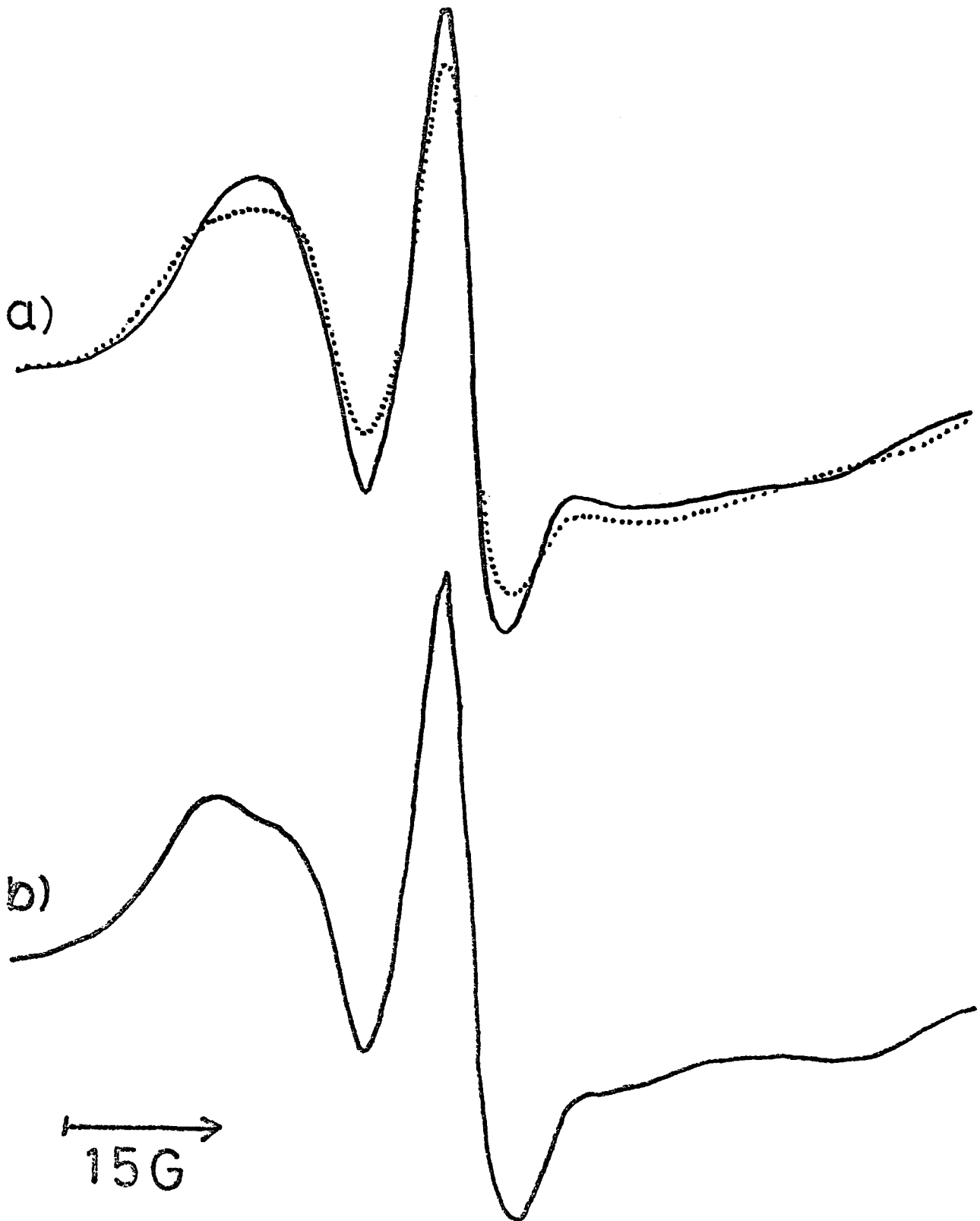


図 25) PS-12PC* (50:1) 膜における Ca^{2+} 効果に対するテトラカインの影響 (79)

a) の実線および b) はそれぞれ 100 mM KCl 溶液から 100 mM KCl - 10 mM CaCl_2 - 10 mM テトラカイン 溶液に移して 10 分後 (a) の実線) 4.5 時間後 (b) の ESR スペクトル
a) の点線は 100 mM KCl - 10 mM CaCl_2 に浸して 10 分後の ESR スペクトル
それぞれの溶液は 50 mM Tris-HCl 緩衝液で pH 7.8 にしてある。
ESR は 23°C で測定



謝辞

この論文を終えるにあたって大西研の皆様
に感謝致します。特に大西俊一先生には、こ
の研究を共に作り、研究・実験を通じて、御指
導していただいたことに、前田豊三さんには
スピララベルしたPSを合成するにあたって適
切な助言をしていただいたことに、徳富哲君
には、12SALの合成を共にしていただいたこと
に深く感謝致します。鬼頭研の鬼頭誠先生、
石永正隆君には、スピララベルしたPSを合成
する際に貴重なPS合成酵素を快く提供して
いただいたことに謝意を表します。