

脂質二分子膜における準チャネルを経由した イオン透過機構への実験的アプローチ

(京大院工) 田中 求

【緒言】

人工的に再構築された、フォトクロミック化合物を担持した脂質二分子膜は、ドーバント分子の光化学反応によって、膜そのものの電氣的／生理的特性を選択的かつ可逆的に変化させる。この系では、ドーバント分子と、マトリクスである脂質二分子膜との間の、分子間相互作用を模式的に表現することが可能で、色素分子のクロモフォア部位の構造変化によって、膜中の脂質分子の局所的な配列が可逆的に変換される。我々はこれまでに、アゾベンゼン[1], [2]やスピロピラン[3]誘導体のようなフォトクロミック分子を含んだリポソームおよび平面脂質二分子膜 (BLM) を作製し、膜のイオン透過性の変化をドーバント分子の光異性化反応によって制御することに成功した。我々は、ここで生じるイオン透過現象は、色素分子の構造変化によって誘起された、脂質分子のバックギングの乱れを経たものであると考え、このイオン透過サイトを「準チャネル(quasi-channel)」と名付けた。「準チャネル」は、脂質膜のkink siteなどを介した拡散輸送と、膜を貫通したポアを形成するイオンチャネル輸送の間に位置する概念である (Fig. 1)。準チャネルは、pAオーダーで安定な二つの導電状態をとり、二状態の間の遷移は、照射光の波長切り替えによって、きわめて選択的かつ可逆的に制御可能である[2]。本研究は、この光制御可能な準チャネルを経たイオン輸送機構への実験的アプローチを目的としている。

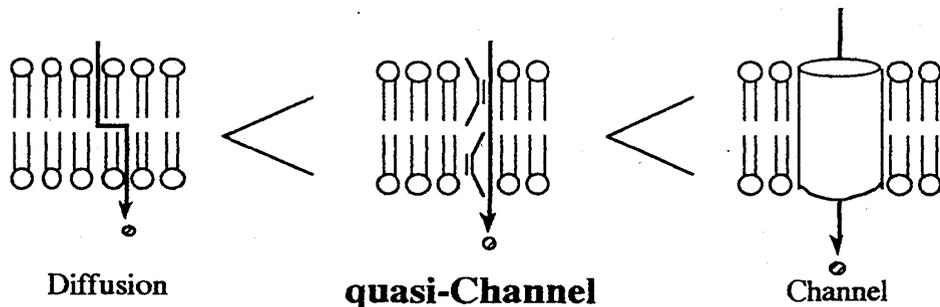
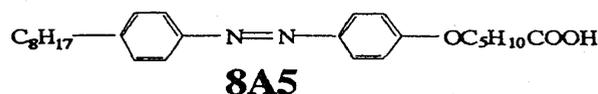


Fig. 1 schematic representation of ion transport through 'quasi-Channel'

(I) アゾベンゼン誘導体含有BLMにおけるイオン透過の光制御

平面脂質二分子膜 (BLM) は、*in-situ*に膜の電気物性変化 (容量・導電性など) をモニターできる点で有用なモデル膜系である。そこで我々は、膜形成脂質には、大豆レシチンを用い、また、アゾベンゼン誘導体として、4-octyl-4'-(5-carboxypentamethyleneoxy)azobenzene (8A5) を用いてアゾベンゼン含有BLMを作製しその光応答をイオン輸送という観点から検討した。このとき、アゾベンゼンの脂質に対するモル分率は 0.15 に設定した。BLMセルの両側は、50 mM - 1 M KCl で満たされ、0 - 100 mV の直流電圧を印加し、紫外光／可視光を交互に照射した時の膜を横切る電流の変化を、銀／塩化銀微小電極を用いて測定した。励起光源には500W 高圧水銀灯を用いた。装置の概略をFig. 2に示す。



アゾベンゼンは、紫外光 ($\lambda = 365 \text{ nm}$) / 可視光 ($\lambda = 450 \text{ nm}$) 交互照射に対して可逆的にトランス / シス光異性化反応を行う。BLMの両側の水槽にそれぞれ500 mM KClを満たし、50 mVの直流電圧を印加した際の電流応答をFig. 3に示す。膜を横切る定常的な電流の大きさは、8A5がトランス体の時で5.0 pA、シス体の時で12.7 pAであった。この定常的な電流値は、照射光の波長切り替えによって、選択的かつ可逆的に制御可能され、8A5がトランス体、シス体それぞれの場合で印加電圧に比例した。この電流シグナルの形から、アゾベンゼンを含むBLMの光応答は、膜の電気伝導度の変化として解釈された。また、同じアゾベンゼンを含むリポソームにおけるイオン透過性変化との比較から、この電気伝導度変化は、アゾベンゼンの異性化によって形成された準チャンネルによって生じる、膜のイオン透過性の変化と対応することが明らかとなった。

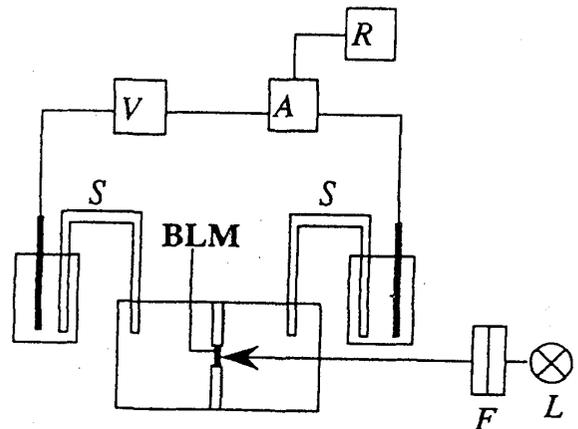


Fig. 2 Schematic representation of experimental set-up.

L, lamp; F, filters; V, power supply; S, salt bridges; A, picoammeter; R, recorder.

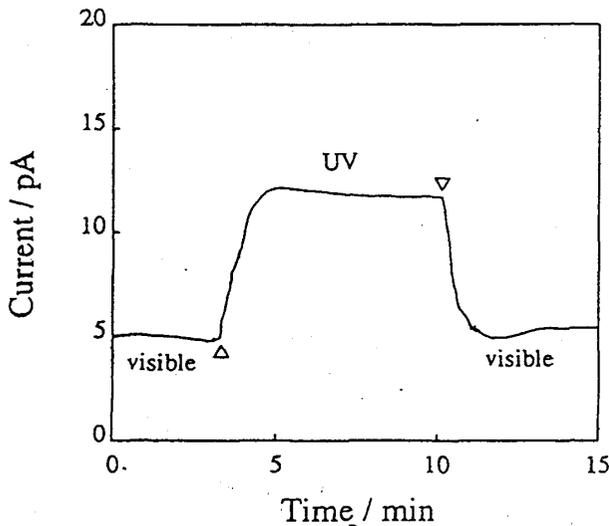


Fig. 3 Changes in the DC current in the BLM cell under alternate irradiation with UV light ($\lambda = 365 \text{ nm}$) and visible light ($\lambda = 450 \text{ nm}$). [KCl] = 500 mM. [8A5]/[lecithin] = 0.15. $V_{app} = 50 \text{ mV}$.

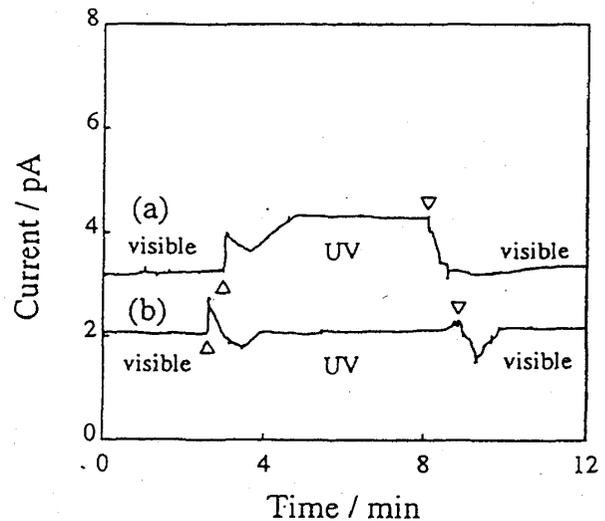


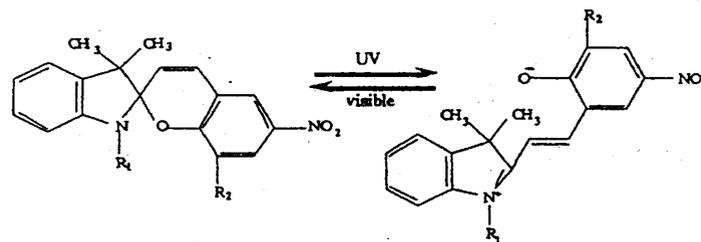
Fig. 4 Transient current signal overlapping with steady dc current in the BLM cell under alternate irradiation with UV light and visible light. [KCl] = 50 mM. [8A5]/[lecithin] = 0.15. V_{app} : (a), 50 mV; (b), 20 mV.

以前我々のグループでは、同じ8A5を含んだ卵黄レシチンBLMにおいて、照射光の波長切り替えに伴って、膜の電気容量の変化に起因するような交流インピーダンス変化を観測している[4]。このときの電解液は10 mM KClで、今回観測されたような定常的な電流変化は見られなかった。そこで、この見かけ上異なった光応答の対応を電解液の濃度から検討した。このBLMセルの両側に、50 mM KClを満たし、20 mV、50 mVの直流電圧を印加した際の電流応答をそれぞれFig. 4に示す。ここでは、波長切り替えに対して、膜の電気容量変化を示唆するような過渡光電流が観測された。特に、印加電圧 $V_{app} = 20 \text{ mV}$ のときには、定常電流には見かけ上変化がなく (2.10 pA)、卵黄レシチンで観測され

たのと似通った電流シグナルを示した。一方、印加電圧を上げていくと、それにオーバーラップするような、膜を横切る定常的な電流の変化が観測された。我々はこの2つの光応答を、準チャンネルの(a)形成(「速い」過渡電流応答)と(b)安定化(「遅い」定常電流変化)という2過程によるものと考え、時定数の解析等から検討を進めている。

(II) スピロピラン誘導体含有BLMにおけるイオン透過の光制御

一方、我々は次頁に示すような構造をもつ、長鎖アルキル基置換スピロピラン誘導体を含む大豆レシチンBLMを作製し、そのアルキル鎖の数や長さが光応答に与える寄与を検討した。スピロピランのリン脂質(大豆レシチン)に対するモル含有率は0.10に設定し、膜の両側の水槽は、それぞれ1.0 M KCl水溶液で満たした。



SP1 : $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$

SP18 : $R_1 = \text{C}_{18}\text{H}_{37}$, $R_2 = \text{H}$

SP1822 : $R_1 = \text{C}_{18}\text{H}_{37}$, $R_2 = \text{CH}_2\text{OCOC}_{21}\text{H}_{43}$

スピロピラン誘導体は紫外光 ($\lambda = 365 \text{ nm}$) を照射するとメロシアニンへと、一方メロシアニンは可視光 ($\lambda = 550 \text{ nm}$) を照射するとスピロピランへと可逆的に光異性化反応を行う。Fig. 5に、SP18 (Fig. 5 (a)) および SP1 (Fig. 5 (b)) を組み込んだ大豆レシチンBLMに、紫外光/可視光を交互に照射したときの電流応答を示す。Fig. 5 (a) に示すように、SP18がメロシアニン型をとっているときには、50.0 pAという定常値をとった膜電流は、可視光照射によって減少し、SP18がスピロピラン型になるとその値は37.5 pAで安定した。アゾベンゼン誘導体含有BLMの場合と同様に、この光応答は照射光の波長切り替えに対して完全な可逆性を示し、スピロピラン/メロシアニンそれぞれについて定常な膜電流値が観測された。一方、長鎖がメチル基と短いSP1を含むBLMでは、同形の信号応答を示したが、その観測された光応答は小さなものであった (Fig. 5 (b))。

SP1, SP18のいずれの場合も、膜を横切る電流値は、紫外光/可視光交互照射下において印加電圧に比例した。SP18を含むBLMの膜導電性は、 $\alpha(\text{SP}) = 7.96 \times 10^{-10} \text{ S}$, $\alpha(\text{MC}) = 9.75 \times 10^{-10} \text{ S}$ であった。ここで、 $\alpha(\text{SP})$, $\alpha(\text{MC})$ はそれぞれ、スピロピラン誘導体がスピロピラン型、メロシアニン型をとったときの膜導電性である。一方、SP1を含む場合は、 $\alpha(\text{SP}) = 1.26 \times 10^{-10} \text{ S}$, $\alpha(\text{MC}) = 1.39 \times 10^{-10} \text{ S}$ であった。このように大きなSP18含有BLMの光応答は、アルキル鎖長、すなわちスピロピラン分子の疎水性が増加すると、ドーバント分子の膜への貫入が深くなり、その結果として、脂質膜のバックギングの乱

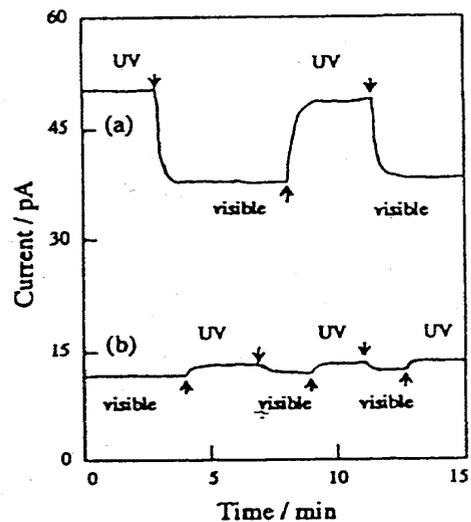


Fig. 5 Changes in the DC current across the BLM containing SP18 and SP1 under continuous irradiation with UV and visible light. The arrows indicate the change from UV to visible light or vice versa.

(a) [SP18]/[lecithin] = 0.10. $V_{\text{app}} = 50 \text{ mV}$.

(b) [SP1]/[lecithin] = 0.10. $V_{\text{app}} = 100 \text{ mV}$.

れ(準チャンネル)が大きくなることによると考えられる。

一方、アルキル鎖を2本もつSP1822は、LB膜中でメロシアニン型をとるときに、J凝集体を形成することが報告されている[5]。そこで次に、このSP1822を含むBLMの光応答を調べた(Fig. 6)。直流20 mV印加時に、照射光を可視光から紫外光へと切り替えると、はじめはSP1, SP18と同様の電流値の増大が観測されるが、紫外光照射を続けると、電流値はもとの電流値とほぼ等しくなるまで減少した。可視光照射によっても電流は変化せず、その後は光応答は観測されなくなった。この結果から、SP1822のJ凝集(スタッキング)によってイオンの透過が阻害されることが予測された。このようなイオン解離型の光異性化を行うスピロピランは、種々の金属イオンに対して特異な親和性をもつことが考えられ、両側のカチオンの組成を変えたBLM系における非対称な光電応答が観測されている。

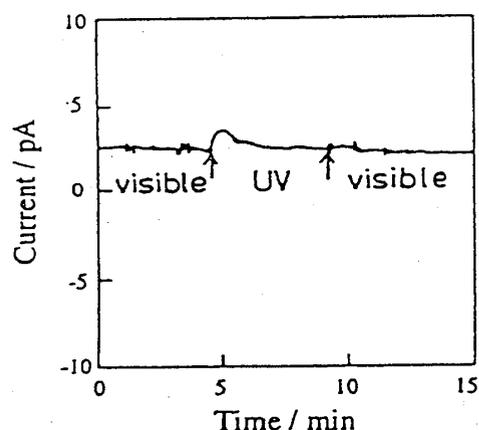


Fig. 6 Changes in the DC current across the BLM containing SP1822 under continuous irradiation with UV and visible light. [SP1822]/[lecithin] = 0.10. $V_{app} = 20$ mV.

【結語】

生体膜におけるイオン透過現象に対しては、これまでにさまざまな人工系からのアプローチがなされてきたが、その分子レベルでの機構には未だに明らかになっていない部分が多い。我々の構築した、光によって開閉可能な「準チャンネル」は、膜貫通型のポアとは異なった透過機構が期待され、今回報告した、BLMによる電気化学的アプローチ以外にも、リボソーム系を用いた、熱力学的あるいは分光学的アプローチが試みられている。

【References】

- [1] M. Tanaka, T. Sato and Y. Yonezawa, *Langmuir*, **11**, 2834 (1995)
- [2] M. Tanaka, Y. Yonezawa, and T. Sato, *Thin Solid Films*, in press
- [3] M. Tanaka and Y. Yonezawa, *J. Phys. Chem.*, **100**, 5160 (1996)
- [4] H. Fujiwara and Y. Yonezawa, *Nature*, **351**, 724 (1991)
- [5] Ando, E.; Miyazaki, j.; Morimoto, K.; Nakahara, H.; Fukuda, K. *Thin Solid Films*, **133**, 21 (1985)