

リン脂質膜のリップル構造について

佐藤幸一 慈恵医大・物理[†]

1 序

生体膜の主要成分はタンパク質と脂質(リン脂質、コレステロール、糖脂質)ですが、膜構造を形成する主役はリン脂質です。天然のものは多量の水に触れるだけで、疎水部分が水を避ける形に集合した脂質二重層膜の多層構造が形成されます。これを砕くと、直径数100nmの球状の多重層リポソームが得られます。

DPPC(dipalmitoylphosphatidylcholine)という合成のレシチン(リン脂質の一種)で作った多重層リポソームの分散系を昇温すると、約33℃で転移(前転移という)を起こし、ゲル相(Gel phase; $L_{\beta'}$)からリップル相(Ripple phase)という中間相(Intermediate phase)に変化し、約42℃で主転移を起こして、流動相(Fluid phase; L_{α} 相:液晶相ともいう)に変化します。主転移温度以下では、脂質分子は結晶格子を組んでいるため自由に動けないが、流動相では自由に拡散(lateral diffusion)するようになります。しかし、リップル相でも一部の脂質分子が流動相と同じ状態になっていることをX線回折やESRのデータが示しています[1][2]。リップル(さざ波)という名称は、多重層膜が11~17nmの間隔で波打つ構造をとることからきています。波形については、正弦波説と鋸歯状波説があります。

DPPCリポソームの電気泳動速度を色々な濃度の CaCl_2 溶液中で、温度を上昇させながら測定すると、リップル相で遅くなり、流動相では更に急激に遅くなります[3]。

この小論では、リップル構造の分子モデルを提出し、モデルの妥当性を検討します。更に、電気泳動の結果をこのモデルに基づいて検討します。

2 リップル相のモデル

レシチンの親水基にはダイポール(−がリン酸基で、+がトリメチル基)があります。DPPC膜の場合、 $L_{\beta'}$ 相では、このダイポールモーメントの方向が膜面と平行であることが示されているので、分子軸と膜面の法線とのなす角を θ とすると、脂質分子軸に対するダイポールモーメントのなす角 θ' は $(\pi/2 - \theta)$ となります。 L_{α} 相では、 $\theta = 0$ であり、親水基の幾何学的パラメータは主転移によって影響を受けない[4]ので、 θ' も主転移前後で変化しないことになります。従って、ダイポールモーメントは膜面に対して θ だけ傾き、リン酸基の位置が溶液側から見て奥になります。

図1は、脂質二重層膜が $L_{\beta'}$ 相とリップル相(P_{β})にあるときの図で、リポソームの一部を拡大した図です。実験値に基づいて、 $\theta = 30^\circ$ [4][5]として描いてあります。

このモデルは電気泳動の結果を説明します。流動状態の L_{α} 相では、 Ca イオンの結合サイトであるリン酸基が奥になるために結合定数 K_{Ca} が減少し、泳動速度が減少する、と考えられます。従って、 P_{β} 相で泳動速度が遅くなる原因は流動状態の脂質が増えることであると解釈出来ます。

[†]東京慈恵会医科大学・物理学教室: 調布市国領町8-3-1, TEL:03-3480-1151(ext.2215), FAX:03-3480-4591.

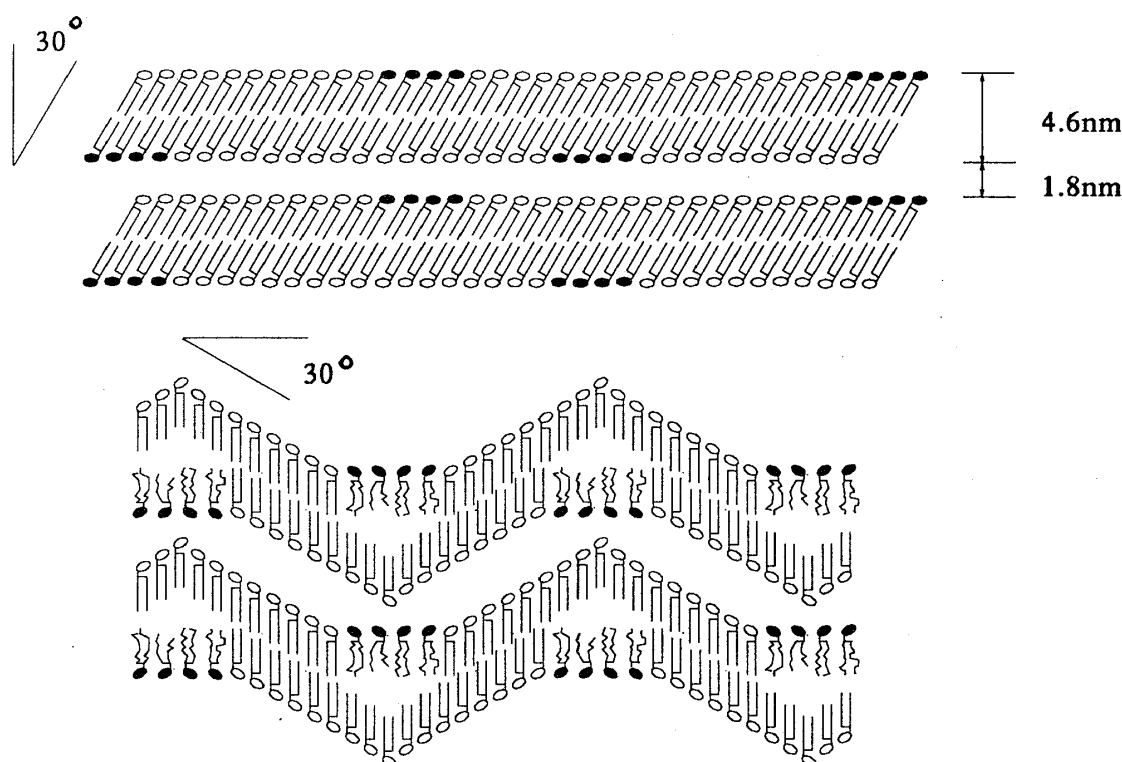


図 1: $L_{\beta'}$ (上) と P_{β} (下) のモデル図; 二つの相の関係が分かりやすくなるように、 P_{β} 相内の流動状態の脂質分子とそれに対応する $L_{\beta'}$ 相内の脂質分子の親水基を塗りつぶしている。

前転移温度以上になると、この図のように $L_{\beta'}$ 相内の脂質分子の一部が流動状態 (Fluid state) に変化します。流動状態の分子の一個の占有面積 A_F はゲル状態 (Gel state) での面積 A_G より大きいため、リップル構造に移行して表面積を増やすと考えられます。

注: 以下でも、添字 G と F はリップル相でのゲル状態と流動状態の部分を表す。

波の間隔がほぼ一定になるように変形するのは、多重層を形成しているため、リップルの振幅が一定の方がエネルギーが低い状態となるためであろうと考えられます。

P_{β} 相において、流動状態になっている脂質分子の割合を α とし、一個のリポソームを形成している脂質膜一枚 (二枚の膜からなる脂質二重層膜の内一枚) に含まれる全脂質分子数を N とします。このとき、

$$N_F = \alpha N, \quad N_G = (1 - \alpha)N \quad (1)$$

となり、ゲル状態になっている部分の総面積 S_G と流動状態になっている部分の総面積 S_F は

$$S_G = N_G A_G, \quad S_F = N_F A_F, \quad (2)$$

となります。

図 2 は、図 1 に示したリップル構造 (鋸歯状波の一種) をとっている一枚の脂質膜を線で示したものです。'Spherical surface' は内接する球面を示しています。

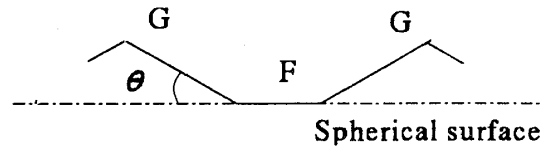


図2: リップル相にある一枚の脂質膜; Gはゲル状態、Fは流動状態の部分を表す。'Spherical surface'は、内接する球面を示す。

この図2にある盛り上がった部分を 'Spherical surface' に投影した総面積 S'_P と、この脂質膜が変形する前の $L_{\beta'}$ 相にあったときの総面積 $S_{\beta'}$ は、

$$S'_P = S_G \cos \theta + S_F, \quad S_{\beta'} = N A_G, \quad (3)$$

と表せます。従って、 S'_P の $S_{\beta'}$ に対する比 γ は、

$$\gamma = \frac{S'_P}{S_{\beta'}} = (1 - \alpha) \cos \theta + \alpha \beta \quad (4)$$

となります。ここで、 A_F は相転移温度以上の L_α 相での脂質分子の占有面積 A_α と等しく、 A_G は $L_{\beta'}$ 相での脂質分子の占有面積 $A_{\beta'}$ に等しいと仮定し、

$$A_\alpha / A_{\beta'} = \beta \quad (5)$$

とめています。

注：以下でも、添字 β' 、P、 α は、それぞれ、 $L_{\beta'}$ 、 P_β 、 L_α の各相を表す。

前転移においてはリポソームの大きさの変化は観測されていないので、 $\gamma = 1$ と仮定します。これは、図2の 'Spherical surface' が、リップル相に変化する前 ($L_{\beta'}$) の膜面と一致することと同じです。

$\alpha = 0.23$ [2] とし、文献にある $A_F(50^\circ\text{C})$ と $A_G(20^\circ\text{C})$ の値から求めた β の値に対して、 θ を (4) 式を用いて計算すると、表1が得られます。 $\beta = 1.46$ が θ の実験値 30° に近い結果を与えることが分かります。

表1: θ の計算値 ($\alpha = 0.23$)

β	1.32 [6]	1.33 [7]	1.46 [7]	1.562 [5] [8]
$\theta(^{\circ})$	25.26	25.7	30.4	33.7

3 電気泳動の結果の検討

リポソームの電気泳動速度を CaCl_2 濃度の関数として測定すれば、得られた結果を再現するようなイオンの結合定数と滑り面の位置 Δ を求めることが出来ます [9]。温度変化させた場合の結果は表2に示した通りです。

表2. パラメータへの相転移の影響 [3]。

T ($^{\circ}\text{C}$)	A (nm^2)*	K_{Ca} (/M)	Δ (nm)	K_{Cl} (/M)	Phase
25	0.495	42 ± 2	0.24 ± 0.02	0.30 ± 0.03	$L_{\beta'}$
38	0.471	26 ± 3	0.24 ± 0.02	0.39 ± 0.07	P_β
44	0.668	10.8 ± 0.8	0.16 ± 0.02	0.48 ± 0.05	L_α

* 文献 [6] のデータ。

注: K の添字 Ca と Cl はそれぞれ Ca イオンと Cl イオンを表す。測定する Ca の濃度範囲は、 Ca イオンが相転移温度を上昇させることを考慮して選んでいる。

リップル構造をとっているため表面が一様ではないので、この表の $38^\circ C$ (P_β 相) での値 (A 、 K 、 Δ) は、平均的な値と考えられます。表 2 の値から α を求めることは出来ないが、これらのパラメータの値からリポソーム表面の電荷密度 σ を求めることが出来ます。

一方、

$$\alpha = \frac{\sigma_{\beta'} - \sigma_P}{(\beta - 1)\sigma_P - \beta\sigma_\alpha + \sigma_{\beta'}} \quad (6)$$

という関係式を導くことが出来るので、 σ の値をこれに代入して、表 1 の $\beta = 1.46$ に対する α を求めることが出来ます。 $CaCl_2$ 濃度 $1 \sim 5$ mM に対して計算すると、 $38^\circ C$ での α の値は 0.24 となり、表 1 (塩を含んでいない場合) で用いた実験値 0.23 とよい一致を示しました。

参考文献

- [1] G.W. Brady and D.B. Fein. An analysis of the X-ray interchain peak profile in dipalmitoylglycerophosphocholine. *Biochim. Biophys. Acta*, 464(1977)249-259
- [2] K. Tsuchida and I. Hatta. ESR studies on the ripple phase in multilamellar phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 945(1988)73-80
- [3] 佐藤幸一、美島清. フォスフォコリンリポソームへの Ca 、 Cl イオンの結合と前転移および主転移の影響——電気泳動法による。コロイドおよび界面化学討論会講演要旨集、48(1995)282-283
- [4] E.J. Dufourc, C. Mayer, J. Stohre, G. Althoff, and G. Kothe. Dynamics of phosphate head groups in biomembranes. *Biophys. J.*, 61(1992)42-57
- [5] M.C. Wiener, R.M. Suter, and J.F. Nagle. Structure of the fully hydrated gel phase of dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biophys. J.*, 55(1989)315-325
- [6] M.J. Janiak, D.M. Small, and G.G. Shipley. Temperature and compositional dependence of the structure of hydrated dimyristoyl lecithin. *J. Biol. Chem.*, 254(1979)6068-6078
- [7] J.F. Nagle and M.C. Wiener. Structure of fully hydrated bilayer dispersions. *Biochim. Biophys. Acta*, 942(1988)1-10
- [8] R.L. Thurmond, S.W. Dodd, and M.F. Brown. Molecular areas of phospholipids as determined by 2H NMR spectroscopy. *Biophys. J.*, 59(1991)108-113
- [9] K. Satoh. Determination of binding constants of Ca^{2+} , Na^+ , and Cl^- ions to liposomal membranes of dipalmitoylphosphatidylcholine at gel phase by particle electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1239(1995)239-248