

解 説

## 脂質二分子膜のリガンド感受性

西本 真琴<sup>a</sup>, 松木 均<sup>b</sup>

<sup>a</sup>和歌山工業高等専門学校 生物応用化学科

<sup>b</sup>徳島大学大学院 社会産業理工学研究部

(受取日: 2022年8月16日, 受理日: 2022年9月18日)

### Ligand Receptivity of Lipid Bilayer Membranes

Makoto Nishimoto<sup>a</sup> and Hitoshi Matsuki<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Applied Chemistry and Biochemistry, National Institute of Technology, Wakayama College

<sup>b</sup> Graduate School of Technology, Industrial and Social Sciences, Tokushima University

(Received Aug. 16, 2022; Accepted Sep. 18, 2022)

Lipid bilayer membranes are the fundamental structure of biological membranes and are responsive to environmental changes such as temperature, pressure and concentrations of other components. Changes in the environment give rise to structural changes in the lipid bilayer membranes called phase transitions. In particular, the effect of membrane-active substances (*i.e.*, ligands) on the phase transitions of lipid bilayer membranes varies significantly depending on the kinds of ligands. This is closely related to the affinities of ligands to the various phases of the bilayer membranes. In this review, the effect of representative ligands, long-chain fatty acids and inhalation anesthetics, on the lipid bilayer membrane under atmospheric and high pressure is described and the differences in ligand affinity to the bilayer membrane are explained thermodynamically.

Keywords: anesthetic, fatty acid, partition coefficient, phase transition, high pressure

#### 1. はじめに

細胞や細胞内小器官における内外の区切りを提供している生体膜は、物質の輸送やシグナル伝達といった重要な生物学的機能を担っている。この生体膜の基本構造は脂質が自己組織化して形成する二分子膜構造の分子集合体であることから、脂質二分子膜は生体膜モデルとして広く用いられている。脂質二分子膜は、温度、圧力、塩濃度、pHなどの環境変化によって二分子膜の構造変化を起こす。相転移と呼ばれるこの構造変化は、脂質二分子膜の環境応答性を把握するための重要な物性であり、過去より示差走査熱量測定 (DSC) を始めとして様々な物理化学的手法を用いて研究がなされている。<sup>1,2)</sup>

生体膜に対して特異的に相互作用する物質は膜作用性物質として知られている。生体中に多く含まれる脂肪酸は、代謝や生体膜脂質における構成物質であるが、実際には、遊離型として細胞中に存在する量は極めて少ない。しかし、この脂肪酸は生体膜と強く相互作用する。また、生体膜と相互作用する代表的な薬物に麻酔薬がある。麻酔メカニズム理論においては現在のところ、麻酔作用は麻酔薬と生体膜中の膜タンパク質との特異的な相互作用に基づくと考えられているが、麻酔作用における麻酔薬の特徴 (構造特異性がない、有効濃度が高い) は、麻酔薬と膜脂質間の非特異的な相互作用が大きな役割を果たしていることを伺わせる。

脂質二分子膜に対する膜作用性物質の影響は、その種類によって大きく異なることが見出されている。我々は、膜作用性物質は生体分子 (脂質) と相互作用することからタンパク質と同様にリガンドとして捉え、脂質二分子膜のリガンドに対する応答性を脂質二分子膜相転移におよぼすリガンド効果に基づき調査してきた。結果、脂肪酸および麻酔薬は脂質二分子膜へ対照的な影響をおよぼすリガンドであることが明らかとなった。本解説では、脂質二分子膜の常圧下および高圧下における相転移に与える脂肪酸および麻酔薬の影響の相違から見えてくる脂質二分子膜のリガンド感受性について紹介する。

#### 2. 二分子膜相転移へおよぼすリガンドの影響

我々は過去より、生体膜中の主要脂質であるグリセロリン脂質の一種、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) を基準脂質として用いて脂質膜研究を進めている。この DPPC 二分子膜が示す相転移に対するリガンド効果を観測し、解析することで種々の有用な情報を得ることができ、**Fig.1** に DPPC とここで述べるリガンドの分子構造と立体構造を示す。DPPC の形成する二分子膜は温度に依存して様々な相状態を示す。<sup>3,4)</sup> 常圧下、未熱的前処理 (アニーリング) の DPPC 二分子膜に対する DSC 測定により観測されるサーモグラムには二つの吸熱ピークが見られる

(Fig.2 左側列中の各サーモグラム内太実線)。約 34 °C で見られる低温側の小さなピークはラメラゲル ( $L_{\beta}$ ) 相からリップルゲル ( $P_{\beta}$ ) 相への多形のゲル相間転移である前転移, 続く約 41 °C で見られる高温側の大きなピークは  $P_{\beta}$  相から液晶 ( $L_{\alpha}$ ) 相への疎水鎖融解転移である主転移に各々対応している。<sup>5-8)</sup>

DPPC 二分子膜の熱的相転移に対する飽和脂肪酸であるパルミチン酸 ( $C_{15}H_{31}COOH$ ), 不飽和脂肪酸であるパルミトレイン酸 ( $C_{15}H_{29}COOH$ ), 吸入麻酔薬であるイソフルラン ( $CF_3CHClOCHF_2$ ) の効果を Fig.2 左側列に示す。DPPC 二分子膜相転移へ与える脂肪酸の効果は, マイクロモルオーダーの非常に低濃度領域で現れる。パルミチン酸の添加により, 前転移ピークと主転移ピーク共に高温側に移行する。その後, 主転移ピークの高濃度側にショルダーピークが現れる。さらなる濃度増加により, 前転移ピークが主転移ピークと合して消失し, 消失濃度以上では, 主転移ピークが小さくなると共にショルダーピークが大きくなるといった複雑な相挙動をとる。パルミトレイン酸の添加では, 前転移ピークは高温側に移行するが, 主転移ピークは

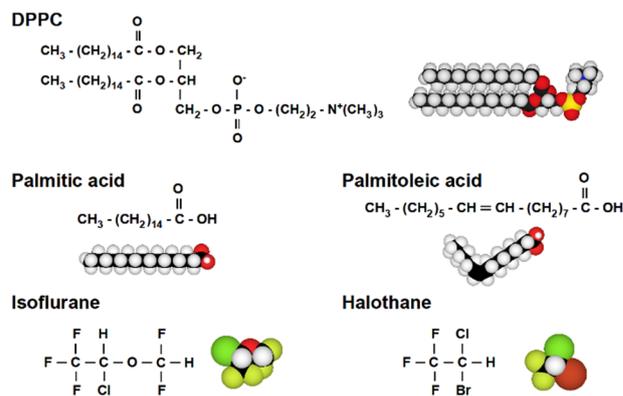


Fig.1 Molecular structures of phospholipid and ligands.

逆に低温側に移行する。その後, ある濃度で前転移ピークが主転移ピークに合して前転移が消失するが, 新たなピークの出現は見られない。これに対して, イソフルラン

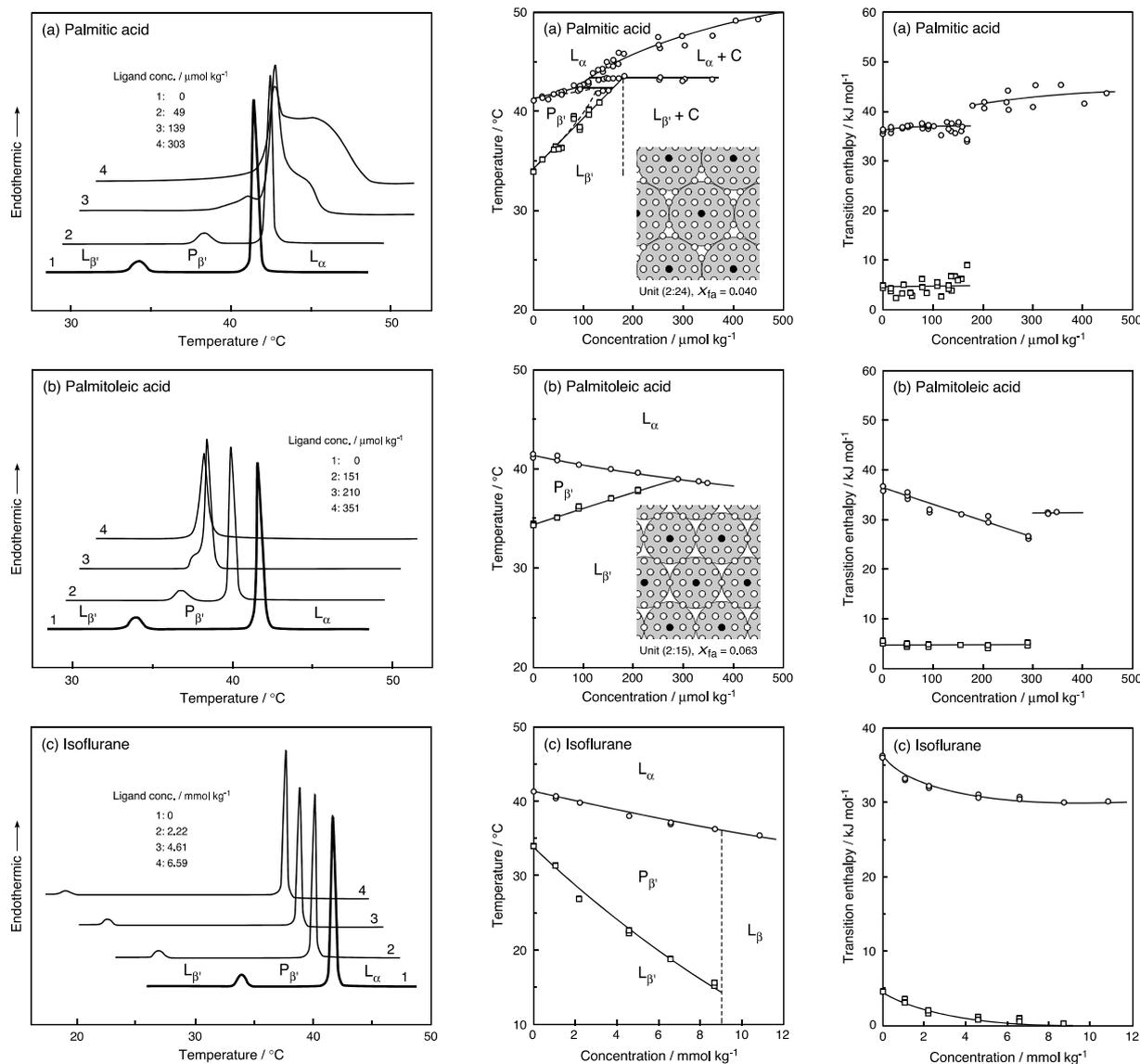


Fig.2 (Left) DSC thermograms of DPPC bilayer membranes at various ligand concentrations. (Middle) Phase diagrams of temperature and ligand concentration for DPPC-ligand systems. C denotes the complex of one DPPC and two fatty-acid molecules. Insets indicate schematic illustration for regular distribution of fatty acid molecules in binary bilayer membranes based on hexagonal lattice model. (Right) Enthalpies of phase transitions of DPPC bilayer membranes as a function of ligand concentration.

の効果は、脂肪酸よりも高濃度を必要とし、ミリモルオーダーの濃度領域で現れる。濃度増加に伴い、前転移ピークと主転移ピークは両者共に低温側へ移行する。前転移ピークは濃度増加と共にブロードとなり、やがて消失する。<sup>9)</sup>

リガンド濃度の関数として DPPC 二分子膜の前転移温度 ( $T_p$ ) および主転移温度 ( $T_m$ ) を決定することで構築した各リガンドに対する温度 ( $T$ ) - 濃度 ( $C$ ) 相図を Fig.2 中央列に示す。パルミチン酸は、 $T_p$  と  $T_m$  を共に上昇させる。一方で、相図中には主転移ピークの分裂に対応する 2 本の包晶線が存在し、これら包晶線の存在と Gibbs 相律を考慮して二相共存の境界線 (破線部分) を引くことができる。パルミチン酸が低濃度の場合、2 本の包晶線によりゲル相は非混和性を示し、前転移消失濃度 (約  $180 \mu\text{mol kg}^{-1}$ ) 以上では高温領域の転移と上側の包晶線の転移のみが存在することがわかる。DPPC-パルミチン酸系の複雑な相挙動は、DPPC 分子とパルミチン酸分子の 1:2 の複合体形成に起因し、二分子膜における両者の強い相互作用を反映している。<sup>10-12)</sup> 不飽和結合を含むパルミトレン酸では、 $T_p$  は上昇、 $T_m$  は降下と相反する挙動をとるが、パルミチン酸のように複雑な相挙動を示さず、相図は比較的単純になる。前転移は主転移に合一して約  $290 \mu\text{mol kg}^{-1}$  で消失する。イソフルランでは飽和脂肪酸の場合と全く逆の効果が現れ、 $T_p$  と  $T_m$  を共に降下させ、前転移は約  $9 \text{ mmol kg}^{-1}$  で消失する。同様な結果は他の吸入麻酔薬、局所麻酔薬や短鎖アルコールなどにも見られている。<sup>13-15)</sup>

DPPC 二分子膜の前転移エンタルピー ( $\Delta H_p$ ) と主転移エンタルピー ( $\Delta H_m$ ) のリガンド濃度依存性を Fig.2 右側列に示す。パルミチン酸添加により、 $\Delta H_m$  値 (複数の分離を伴う主転移ピークの全エンタルピー値) は僅かに上昇するが、 $\Delta H_p$  値は前転移が消失するまでほぼ一定である。前転移消失後のエンタルピー値は  $\Delta H_p$  と  $\Delta H_m$  の和にほぼ等しくなるが、リガンド非存在下の総和よりも大きくなる。パルミトレン酸添加では、パルミチン酸添加と同様に  $\Delta H_p$  は前転移消失までほぼ一定であるが、 $\Delta H_m$  は大幅に減少する。前転移消失後はエンタルピーが不連続に増加し、一定値を示すが、リガンド非存在下の  $\Delta H_m$  値よりも小さくなる。一方、イソフルラン添加により、 $\Delta H_p$  値と  $\Delta H_m$  値は共に減少し、特に  $\Delta H_p$  値は前転移の消失濃度で 0 となる。

### 3. 脂質分子とリガンド分子の膜内相互作用

前転移は二分子膜の充填具合や表面構造の変化を反映し、主転移は脂質分子アシル鎖のトランス-ゴーシュ配座変化を反映することから、各リガンドは膜中へ移行した際に、これら変化に異なる影響を与えている。脂質二分子膜の相転移温度は二分子膜の二つの相における化学ポテンシャル曲線の交点温度であると捉えれば、リガンド添加による化学ポテンシャル曲線の変化が相転移温度変化を引き起こすことに対応する。DPPC 二分子膜への飽和脂肪酸と麻酔薬の効果についての化学ポテンシャル曲線の模式図を Fig.3 に示す。ここで、リガンド低濃度条件下、熱力学的束一性の枠組みの中で、リガンドの水相および脂質二分子膜の二相における分配平衡を考えると、リガンド添加による脂質二分子膜の相転移温度変化 ( $\Delta T_i$ ) は、水と脂質二分子膜各相間の分配係数の差 ( $\Delta K_i$ ) に関連づけられる。<sup>16-18)</sup>

$$\Delta T_i = T_i - T_i' = (RT_i^2 \Delta K_i m_L) / (55.5 \Delta H_i), \quad i = m, p \quad (1)$$

ここで、添字の p および m は前転移と主転移であり、 $m_L$  はリガンド濃度 ( $\text{mol kg}^{-1}$ )、 $\Delta H_i$  は DPPC 二分子膜の相転移エンタルピー、 $\Delta K_i$  は以下に定義される脂質二分子膜の二相に対するリガンドの分配係数の差である。

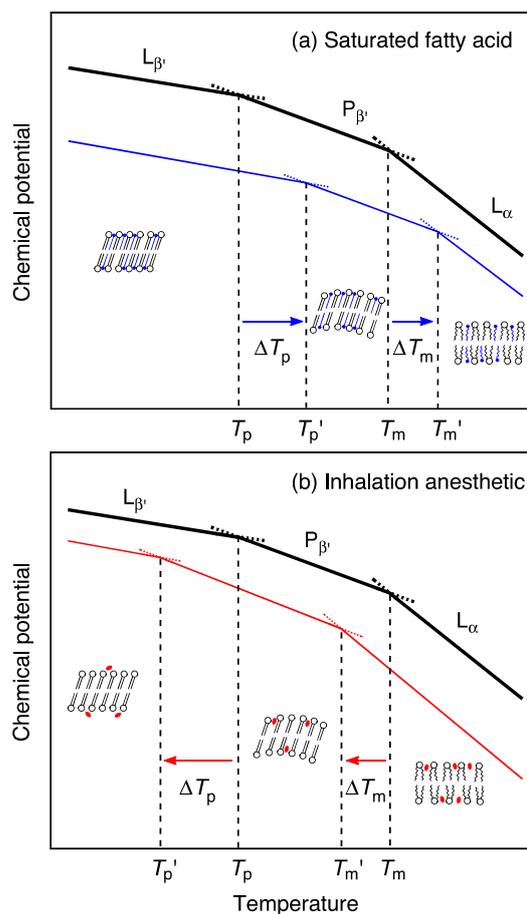


Fig.3 Chemical potential curves of DPPC-ligand system in the absence (bold line) and presence (colored line) of a ligand.

$$\Delta K_p = K(P_{\beta'}) - K(L_{\beta'}) \quad (2)$$

$$\Delta K_m = K(L_{\alpha}) - K(P_{\beta'}) \quad (3)$$

ここで、 $K(L_{\beta'})$ 、 $K(P_{\beta'})$ 、 $K(L_{\alpha})$ は、モル分率単位で定義される各リガンドの  $L_{\beta'}$ 相、 $P_{\beta'}$ 相、 $L_{\alpha}$ 相への分配係数である。また、(2)式と(3)式から  $L_{\beta'}$ 相と  $L_{\alpha}$ 相間の分配係数を得る。

$$\Delta K_p + \Delta K_m = K(L_{\alpha}) - K(L_{\beta'}) \quad (4)$$

Fig.2 中の  $T$ - $C$  相図と  $\Delta H_i$  値を用いて各リガンドに対して決定した分配係数差の値を Table1 に挙げる。<sup>9)</sup> ここで、比較のために脂肪酸に対しては鎖長の異なる同族体の結果を、麻酔薬に対しては代表的な吸入麻酔薬であるハロセンの結果も含めてある。飽和脂肪酸の分配係数差値は全て負となることから、飽和脂肪酸の分配係数値は、 $L_{\alpha}$ 相、 $P_{\beta'}$ 相、 $L_{\beta'}$ 相の順序で増大する。飽和脂肪酸は  $L_{\alpha}$ 相よりもゲル相に優先的に取り込まれ、 $L_{\beta'}$ 相への分配が全ての相の中で最も大きくなる。また、DPPC 二分子膜への飽和脂肪酸の分配はそのアシル鎖長に依存し、DPPC 分子のアシル鎖に相応するパルミチン酸で最大となる。不飽和脂肪酸の場合、 $\Delta K_p$  値は負、 $\Delta K_m$  値および  $\Delta K_p + \Delta K_m$  値は正となる。それ故に、不飽和脂肪酸の DPPC 二分子膜への分配は、 $P_{\beta'}$ 相、 $L_{\beta'}$ 相、 $L_{\alpha}$ 相の順となる。飽和脂肪酸の場合と異なり、不飽和脂肪酸は DPPC 二分子膜の  $L_{\alpha}$ 相へ最も多く取り込まれ、ゲル相では分子運動の大きい  $P_{\beta'}$ 相よりも分子運動の小さい  $L_{\beta'}$ 相に多く取り込まれる。不飽和結合の折れ曲がった構造は、ゲル相よりも  $L_{\alpha}$ 相での取り込みに有利であると言える。 $P_{\beta'}$ 相への移行が少ない理由は、まだ定かではないが、不飽和脂肪酸の分子構造の二分子膜波打ち構造とのマッチングはあまりよくないものと推測される。他方、吸入麻酔薬では、

**Table 1** Differential partition coefficients of fatty acids and inhalation anesthetics into DPPC bilayer membrane at 0.1 MPa.

Ligand	$\Delta K_p$	$\Delta K_m$	$\Delta K_p + \Delta K_m$
Lauric acid	-8000	-8100	-16100
Myristic acid	-16100	-19600	-35700
Palmitic acid	-23500	-36000	-59500
Stearic acid	-16800	-27900	-44700
Palmitoleic acid	-7300	19600	12300
Oleic acid	-10100	18600	8500
Isoflurane	1040	1270	2310
Halothane <sup>a</sup>	820	2560	3380

<sup>a</sup> Kaneshina, et al.<sup>16)</sup>

飽和脂肪酸の結果とは正反対に分配係数差値は全て正となり、その分配はL<sub>β</sub>相、P<sub>β</sub>相、L<sub>α</sub>相の順に増加する。すなわち、麻酔薬は揺らぎの大きいL<sub>α</sub>相に優先的に分配する。また、麻酔薬と脂肪酸の分配係数の大きさを比較してみると、各リガンドの有効濃度を反映し、麻酔薬は約10<sup>3</sup>オーダー、脂肪酸は薬10<sup>4</sup>オーダーとなり、脂肪酸は麻酔薬の10倍以上も多くDPPC二分子膜に取り込まれている。

上述の分配係数は、二分子膜各相間においてDPPC分子とリガンド分子間の無限希釈における理想混合に基づいて議論したが、実際は両者間には相互作用が働く。二分子膜における脂質分子とリガンド分子間に働く相互作用を考察してみる。DPPC二分子膜への脂肪酸の添加は、脂肪酸の種類依らずにT<sub>p</sub>を増加させるが、ΔH<sub>p</sub>値には脂肪酸濃度依存性は見られず、ほぼ一定値となる。この事実はゲル相中における両分子間相互作用は膜中への分配挙動には影響してL<sub>β</sub>相の安定化をもたらすが、熱(格子)エネルギーに影響を与える程大きくはなく、DPPC二分子膜中の脂肪酸がDPPC分子と同じ傾斜した構造を保っていることを意味する。脂質二分子膜のゲル相における脂質分子と脂肪酸分子の相互作用は、六方格子モデルを用いて考察できる。<sup>19-21)</sup>

脂肪酸添加による前転移消失濃度に基づいて決定されたDPPC二分子膜の六方格子中のパルミチン酸およびパルミトレイン酸の分布様式をFig.2中央列中の相図内に示す。二つの疎水鎖(DPPC1分子と脂肪酸2分子)が1格子点を占めると仮定し、疎水鎖あたりの脂肪酸のモル分率(X<sub>fa</sub>)を前転移消失濃度において求めてみると、パルミチン酸では0.043、パルミトレイン酸では0.068となる。これらは、六方格子を仮定した二分子膜内における脂肪酸分布が、パルミチン酸では2:24(X<sub>fa</sub>=0.040)の構成ユニット(二分子膜が2個のパルミチン酸分子と24個のDPPC分子で構成されたユニット)から、パルミトレイン酸では2:15(X<sub>fa</sub>=0.063)の構成ユニットから成り立っていることに相応する。構成ユニットの大きさは、脂肪酸の分子構造に依存しており、DPPC分子のアシル鎖に相当するパルミチン酸とDPPC分子間の相互作用がDPPC二分子膜のゲル相に最も広範囲に及ぶ。この非常に強い相互作用がパルミチン酸高濃度領域における1:2の複合体を形成する要因となる。脂肪酸分子中における二重結合の存在により、二分子膜中のDPPC分子と脂肪酸分子の相互作用がおよぶ距離は減少する。

他方、イソフルランの場合においては、DPPC二分子膜への作用濃度がミリモルオーダーと高いことから、二分子膜内濃度と水溶液中濃度を分けて考える必要がある。以前の研究でなされた分配係数の直接測定の結果<sup>22,23)</sup>と今回の分配係数差の結果より、前転移の消失濃度における各膜状態でのイソフルラン濃度を概算すると、L<sub>β</sub>相はL<sub>α</sub>相の5%

以下となり、イソフルランはL<sub>α</sub>相に優先的に分配され、L<sub>β</sub>相にはほとんど分配されないことが分かる。イソフルランでは、相転移に伴いその分配量が大きく変化することから六方格子モデルは適用できず、水溶液中のイソフルラン分子の一部のみが二分子膜に影響をおよぼしている。さらにイソフルランの添加は、約30°の傾斜を持つL<sub>β</sub>およびP<sub>β</sub>相を消失させ、L<sub>α</sub>相に完全に移行させる。水溶液中に多量に存在するイソフルランは、DPPC二分子膜の表面付近に非特異的に作用して前転移に顕著な影響を与えるのと同時に、DPPC二分子膜アシル鎖にゴースク配座をもたらすΔH<sub>m</sub>値を引き下げるといった脂肪酸とは対照的な挙動をとる。

#### 4. 高圧力下におけるリガンドの分配挙動

麻酔薬の作用が高圧力下において消失することは「麻酔の圧力拮抗」としてよく知られた事実であり、この現象には加圧によるリガンドの生体膜中への結合(あるいは分配)挙動と密接に関係している。次に、脂質二分子膜中へのリガンドの分配挙動に高圧力がおよぼす影響について述べる。光透過率(濁度)測定や蛍光プローブ測定により、圧力一定の条件下においてリガンド非存在下および存在下における脂質二分子膜の相転移温度を決定できる。<sup>9,18)</sup> Fig.4左側列に、DPPC二分子膜の相転移温度(T<sub>p</sub>およびT<sub>m</sub>)におよぼす飽和脂肪酸(パルミチン酸)および吸入麻酔薬(ハロセン)の効果への圧力の影響を示す。先にFig.2で示したように、パルミチン酸はマイクロモルオーダーで両転移温度を上昇させるのに対して、ハロセンはミリモルオーダーで両転移温度を逆に低下させる。加圧により、両転移温度は圧力依存的に上昇することから、DPPC二分子膜に対して圧力はパルミチン酸と相乗的に、ハロセンとは逆に拮抗的に作用することが分かる。

各圧力一定下、常圧下と同様にΔK<sub>p</sub>、ΔK<sub>m</sub>およびΔK<sub>p</sub>+ΔK<sub>m</sub>の値を計算することができる。これら分配係数差値の圧力依存性をFig.4中央列に示す。ここで、分配係数差値はその絶対値を対数プロットしている。DPPC-パルミチン酸系では、加圧によりΔK<sub>p</sub>値は増加し、ΔK<sub>m</sub>値は逆に減少するが、DPPC-ハロセン系ではどちらの値も減少する。DPPC-パルミチン酸系では、ΔK<sub>p</sub>とΔK<sub>m</sub>の両値がある圧力下で一致する。この交点では、両値は等しいので次式が成り立つ。

$$K(P_{\beta}) = (K(L_{\beta}) + K(L_{\alpha}))/2 \quad (5)$$

これは、P<sub>β</sub>相に分配されるパルミチン酸量がL<sub>β</sub>とL<sub>α</sub>相に分配される量の平均に等しいことを意味している。この挙動は、パルミチン酸分子がDPPC二分子膜の構成する3相全てに分配されていることを示しており、L<sub>α</sub>相に優先的に分配されているハロセン分子と対照的である。

分配係数差の圧力依存性からは、リガンドの体積挙動についての情報を得ることができる。水溶液から脂質二分子膜(i相)へのリガンド移行に伴う体積変化(ΔV<sub>p</sub><sup>0</sup>)は、対応するエンタルピー変化(ΔH<sub>p</sub><sup>0</sup>)と脂質二分子膜の相転移温度の圧力依存性(dT/dp)に関連づけられる。<sup>16,18)</sup>

$$\Delta V_p^0(i) = \Delta H_p^0(i)/T(dT/dp) - RT(d \ln K(i)/dp) \quad (6)$$

実験的に得られるのは分配係数差値の圧力依存性であることから、ここでは両リガンドの二分子膜への分配に仮定を導入し、ゲル相とL<sub>α</sub>相間の体積変化の差異を考察する。パルミチン酸はその強い疎水性により、DPPC二分子膜の全ての相に分配する。長鎖脂肪酸が水溶液から脂質二分子膜のような非極性環境に移行する場合の体積増加を考慮し、<sup>24,25)</sup> 今回のDPPC二分子膜のL<sub>α</sub>相へのパルミチン酸の移行体積(ΔV<sub>p</sub><sup>0</sup>(L<sub>α</sub>))は約25 cm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>であると仮定した条件下、等温滴定熱量測定により報告されているパルミチン

酸の分配係数値と $\Delta H_f^0(i)$ 値<sup>26)</sup>と DPPC 二分子膜相転移の  $dT/dp$  値<sup>8)</sup>を Fig.4 中央列の高圧力下の $\Delta K_p$ と $\Delta K_m$ の値と組み合わせることにより、(6)式により  $L_\beta$ 相への移行体積 ( $\Delta V_f^0(L_\beta)$ )を見積もると、約  $20 \pm 1 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ となる。この事実は、DPPC 二分子膜ゲル相へのパルミチン酸分子の移行体積は、 $L_\alpha$ 相へのものと比較して約 20%減少していることを意味する。DPPC 二分子膜の  $L_\beta$ 相のモル体積は  $L_\alpha$ 相よりも小さいこと<sup>8)</sup>および水溶液中のパルミチン酸の部分モル体積が測定温度範囲においてほぼ一定であることから<sup>24)</sup>パルミチン酸分子は $L_\alpha$ 相よりも体積の小さい $L_\beta$ 相に優先的に分配することで二分子膜中のパルミチン酸分子がより密に充填され、その体積減少を引き起こしていると言える。また、 $\Delta V_f^0(P_\beta)$ 値については分配係数の順序から $\Delta V_f^0(L_\beta)$ と $\Delta V_f^0(L_\alpha)$ の間値を持つと予想される。

一方、高圧力下でのハロセンの分配挙動はパルミチン酸と大きく異なっている。ハロセン分子は DPPC 二分子膜の  $L_\alpha$ 相に優先的に分配され、上述したように  $L_\beta$ 相へのハロセン分子の分配は無視できるほど小さいことを考慮すると、 $K(L_\beta)$ はほぼ 0 とみなすことができる。結果、 $d \ln \Delta K_p/dp$ と  $d \ln (\Delta K_p + \Delta K_m)/dp$ は  $d \ln K(P_\beta)/dp$ と  $d \ln K(L_\alpha)/dp$ と近似し、これら傾きと $\Delta H_f^0(i)$ 値<sup>22)</sup>と  $dT/dp$  値を(6)式へ適用することにより、 $\Delta V_f^0(P_\beta)$ と $\Delta V_f^0(L_\alpha)$ の値を算出できる。算出された各々の値は、 $10 \pm 2 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ および $20 \pm 4 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ となり、DPPC 二分子膜へハロセン分子が移行するとパルミチン酸同様に体積増加し<sup>27)</sup>  $L_\alpha$ 相への移行体積はゲル相の約 2 倍であることが理解できる。パルミチン酸とハロセンの移行体積の傾向は同じ ( $\Delta V_f^0(L_\alpha) > \Delta V_f^0(L_\beta)$ または $\Delta V_f^0(P_\beta)$ )であるが、ゲル相と  $L_\alpha$ 相への両リガンドの分配挙動は正反対である。多数のハロセン分子の移行による体積増加は、DPPC 二分子膜がハロセン分子によって大きく乱されていることを示唆している。

5. 高圧力下における二分子相挙動への影響

最後に DPPC 二分子膜相挙動へのリガンド効果を考察する。リガンド存在下における DPPC 二分子膜の相転移データが温度および圧力の関数として得られているので、リガンド非存在下および存在下における DPPC 二分子膜の温度 ( $T$ ) - 圧力 ( $p$ ) 相図を構築することができる。Fig.4 右側列は、パルミチン酸 ( $50 \mu\text{mol kg}^{-1}$ ) またはハロセン ( $3 \text{ mmol kg}^{-1}$ ) 存在下での膜状態を非存在下 (白抜き記号) のものと  $T$ - $p$  相図上で比較したものである。<sup>18)</sup> リガンド非存在下では、 $T_p$ と  $T_m$ は加圧により増加し、約 100 MPa 以上の高圧力下においては、ゲル相多形の一つで非二分子膜状態である指組みゲル ( $L_{\beta I}$ ) 相が誘起される。パルミチン酸を添加すると、 $T_p$ と  $T_m$ が上昇するために前転移曲線と主転移曲線は高温側に移行し、その移行度合は前転移曲線の方が大きい。 $L_{\beta I}$  相に関する転移においては、 $L_\beta/L_{\beta I}$  転移曲線は同様に高温側に移行するが、 $L_\beta/P_\beta$ 転移曲線は逆に低温側に移行する。これに対して、ハロセンを添加すると、パルミチン酸とは正反対の挙動を示す。前転移曲線、主転移曲線はおよび  $L_\beta/L_{\beta I}$  転移曲線は低温側に移行し、 $L_\beta/P_\beta$ 転移曲線は逆に高温側に移行する。結果として、 $L_{\beta I}$  相の領域はパルミチン酸を添加するとより高圧領域に、ハロセンを添加するとより低圧領域に移動する。また、 $L_\beta/P_\beta$ の転移曲線はハロセン添加をした場合、パルミチン酸を添加した場合よりも大きく変化する。この差異は、両リガンドの膜中における分配領域 (パルミチン酸: 膜コア部, ハロセン: 膜界面部) および  $L_{\beta I}$  相が示す二分子膜-非二分子膜間の圧力ヒステリシスに関連しており、DPPC-パルミチン酸系では、 $L_{\beta I}$  相コア部に移行したパルミチン酸分子による充填構造変化とヒステリシスにより  $L_\beta/P_\beta$ 転移曲線の変化が小さいものと推測している。

リガンド低濃度下、DPPC 二分子膜に分配するパルミ

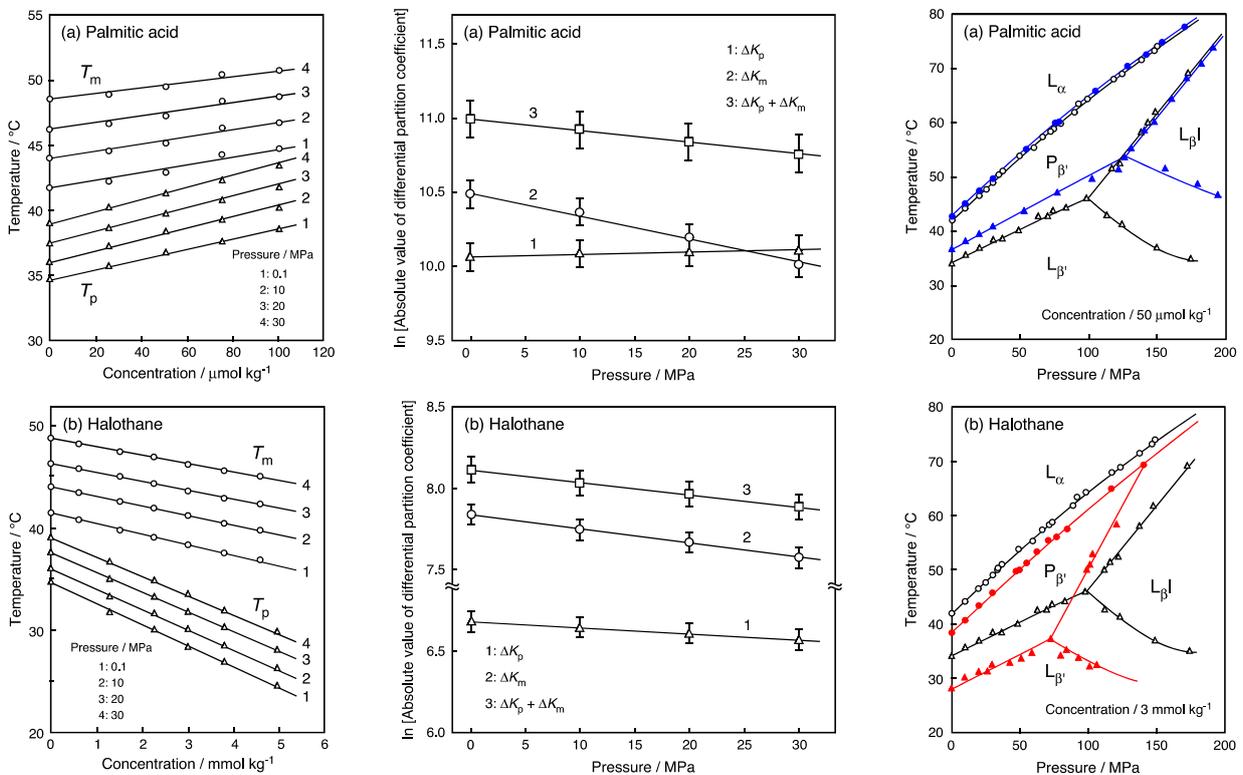


Fig.4 (Left) Temperature-ligand concentration phase diagrams of DPPC-ligand binary bilayer membranes under atmospheric and high pressure. (Middle) Effect of pressure on the differential partition coefficients of a ligand between the aqueous solution and the DPPC bilayer membrane. (Right) Temperature-pressure phase diagrams of DPPC-ligand binary bilayer membranes in the absence and presence of a ligand.

チン酸の量は、 $L_{\alpha} < P_{\beta} < L_{\beta}$ の相順序で増加するため、相安定性は同じ順序で増大する。この順序から、不等式中における右側の相から左側の相への転移温度はパルミチン酸添加により上昇し、前 ( $L_{\beta}/P_{\beta}$ ) 転移温度と主 ( $P_{\beta}/L_{\alpha}$ ) 転移温度の挙動が対応している。対照的に、ハロセンの DPPC 二分子膜への分配は、逆の相順序 ( $L_{\beta} < P_{\beta} < L_{\alpha}$ ) となることから、前転移と主転移の温度はハロセン添加により降下することになる。 $L_{\beta}I$  相に関しては、DPPC 二分子膜では高圧力誘起相であるために、 $L_{\beta}I$  相中へのリガンドの分配係数についての情報は得られないが、リガンド添加による  $L_{\beta}I$  相に関する相転移温度の変化から各リガンドの  $L_{\beta}I$  相への分配挙動を逆に予測することができる。パルミチン酸添加により、 $L_{\beta}/L_{\beta}I$  転移温度は上昇し、 $L_{\beta}I/P_{\beta}$  転移温度は降下する。それ故に、 $K(L_{\beta}) > K(L_{\beta}I)$  および  $K(L_{\beta}I) < K(P_{\beta})$  の不等式を満足する。その結果、 $K(L_{\beta}I) < K(P_{\beta}) < K(L_{\beta})$  の不等式が成り立ち、パルミチン酸の  $L_{\beta}I$  への分配量はゲル相中で最も少なくなる。ハロセンの添加では正反対の結果となり、 $L_{\beta}/L_{\beta}I$  相転移温度は降下し、 $L_{\beta}I/P_{\beta}$  相転移温度は上昇する。この場合、 $K(L_{\beta}) < K(L_{\beta}I)$  および  $K(L_{\beta}I) > K(P_{\beta})$  の不等式を満足し、 $K(L_{\beta}) < K(P_{\beta}) < K(L_{\beta}I)$  の不等式を導く。これは、ハロセン分子の  $L_{\beta}I$  相への分配量がゲル相の中で最大であることを示唆する。これらの結果は、水和のみで  $L_{\beta}I$  相を形成する DPPC の同族体脂質であるジヘキサデシル PC が形成する二分子膜において得られた結果と完全に一致する。<sup>17,28)</sup> 圧力は DPPC 二分子膜に  $L_{\beta}I$  相を誘起する。パルミチン酸はゲル相中では  $L_{\beta}I$  相に最も少なく分配して  $L_{\beta}I$  相を不安定化するのに対して、ハロセンでは逆に最も多く分配して  $L_{\beta}I$  相を安定化させる。結果、DPPC 二分子膜の圧力誘起  $L_{\beta}I$  相形成に対して、パルミチン酸の効果は圧力と拮抗する一方で、ハロセンの効果は逆に圧力と相乗することになり、両リガンドは対照的な効果をもたらす。

## 6. おわりに

本稿では、脂質二分子膜への膜作用性リガンドの効果をその相転移温度変化や熱力学的相図に基づいて述べた。これまで脂質二分子膜は、分子認識能が核酸やタンパク質などに比べて低いと考えられてきたが、そもそも両者の分子認識能には差異がある。核酸やタンパク質は共有結合で構成ユニットであるヌクレオチドやアミノ酸が共有結合で連結した生体高分子であるのに対して、脂質二分子膜は構成ユニットが疎水性相互作用で自己組織化した分子集合体である。したがって、核酸やタンパク質はリガンドの「構造 (コンフォメーション)」を1分子として識別できるが、脂質は1分子では識別できず、集合体自体 (すなわち脂質二分子膜) が「状態」としてリガンドを認識する。その意味では、後者にはリガンドが分配すると言うのが妥当である。この脂質二分子膜へのリガンドの分配は、(1) 分配量 (低濃度から高濃度、いわゆる分配係数)、(2) 分配位置 (膜の中心コア部、中間領域、極性頭部 (界面) 近傍)、(3) 相親和性 (固体 (ゲル) 相、液体 (液晶) 相) の3つの因子で特徴づけられる。今回示した結果からは、長鎖脂肪酸は低濃度で中間領域に分配し、吸入麻酔薬は高濃度で界面近傍に分配することが理解できる。常圧下や高圧力下において、脂質二分子膜の相転移温度がリガンドの種類やその作用濃度に依存して鋭敏に変化する事実は、脂質は集合体として十分な分子認識能を有することを明示している。

## 文 献

- 1) R. N. McElhaney, *Chem. Phys. Lipids* **30**, 229-259 (1982).
- 2) R. N. A. H. Lewis, D. A. Mannock, and R. N. McElhaney, "Methods in Membrane Lipids.", Totowa, New Jersey (2007).

- 3) A. J. Verkleij and J. de Gier, "Liposomes: from Physical Structure to Therapeutic Applications", Elsevier, Amsterdam (1981).
- 4) R. N. A. H. Lewi and R. N. McElhaney, "The Structure of Biological Membrane, 2nd ed.", CRC Press, London (2005).
- 5) J. Stümpel, A. Nicksch, and H. Eibl, *Biochemistry* **20**, 662-665 (1981).
- 6) R. N. A. H. Lewis, N. Mak, and R. N. McElhaney, *Biochemistry* **26**, 6118-6126 (1987).
- 7) H. Ichimori, T. Hata, T. Yoshioka, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Chem. Phys. Lipids* **89**, 97-105 (1997).
- 8) H. Ichimori, T. Hata, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Biochim. Biophys. Acta* **1414**, 165-174 (1998).
- 9) M. Nishimoto, T. Hata, M. Goto, N. Tamai, and S. Kaneshina, H. Matsuki, and I. Ueda, *Chem. Phys. Lipids* **158**, 71-80 (2009).
- 10) S. E. Schullery, T. A. Seder, D. A. Weinstein, and D. A. Bryant, *Biochemistry* **20**, 6818-6824 (1981).
- 11) A. B. Kohn and S. E. Schullery, *Chem. Phys. Lipids* **37**, 143-153 (1985).
- 12) T. Inoue, S. Yanagihara, Y. Misono, and M. Suzuki, *Chem. Phys. Lipids* **109**, 117-133 (2001).
- 13) T. Hata, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Biophys. Chem.* **87**, 25-36 (2000).
- 14) J. A. Veiro, P. Nambi, L. L. Herold, and E. S. Rowe, *Biochim. Biophys. Acta* **900**, 230-238 (1987).
- 15) E. S. Rowe and T. A. Cuttera, *Biochemistry* **29**, 10398-10404 (1990).
- 16) S. Kaneshina, H. Kamaya, and I. Ueda, *J. Colloid Interface Sci.*, **93**, 215-224 (1983).
- 17) T. Hata, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Colloids Surf., B: Biointerf.* **18**, 41-50 (2000).
- 18) H. Matsuki, K. Kato, H. Okamoto, S. Yoshida, M. Goto, N. Tamai, and S. Kaneshina, *Chem. Phys. Lipids* **209**, 9-18 (2017).
- 19) J. A. Virtanen, M. Ruonala, M. Vauhkonen, and P. Somerharju, *Biochemistry* **34**, 11568-11581 (1995).
- 20) P. Somerharju, J. A. Virtanen, and K. H. Cheng, *Biochim. Biophys. Acta* **1440**, 32-48 (1999).
- 21) N. Tamai, T. Izumikawa, S. Fukui, M. Uemura, M. Goto, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 2513-2523 (2013).
- 22) S. A. Simon, T. J. McIntosh, P. B. Bennett, and B. B. Shrivastav, *Mol. Pharmacol.* **16**, 163-170 (1979).
- 23) N. Janes, J. W. Hsu, E. Rubin, and T. F. Taraschi, *Biochemistry* **31**, 9467-9472 (1992).
- 24) G. Akgul, E. Bayram, and E. Ayranci, *J. Solution Chem.* **35**, 1655-1671 (2006).
- 25) G. H. Peters, F. Y. Hansen, M. S. Møller, and P. Westh, *J. Phys. Chem. B* **113**, 92-102 (2009).
- 26) P. Høyrup, J. Davidsen, and K. Jørgensen, *J. Phys. Chem. B* **105**, 2649-2657 (2001).
- 27) Y. Kita, L. J. Bennett, and K. W. Miller, *Biochim. Biophys. Acta* **647**, 130-139 (1981).
- 28) S. Maruyama, T. Hata, H. Matsuki, and S. Kaneshina, *Colloids Surf. B: Biointerf.* **8**, 261-266 (1997).



西本 真琴  
Makoto Nishimoto  
E-mail: ma-nishimoto@wakayama.kosen-ac.jp



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