

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26400431

研究課題名(和文) コレステロールを含まない脂質二分子膜で出現する秩序液体相の探索

研究課題名(英文) Search for the liquid-ordered phase appeared in cholesterol-free lipid bilayers

研究代表者

八尾 晴彦 (Yao, Haruhiko)

京都工芸繊維大学・材料化学系・准教授

研究者番号：60212271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々が開発した超高感度DSCを用いて、コレステロールを含まない脂質二分子膜の秩序液体相(lo相)を探索した。その結果、ジアンデカノイルホスファチジルコリン(DC11PC)、ジトリデカノイルホスファチジルコリン(DC13PC)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール(DC14PG)のゲル-液晶相転移において複数の熱異常が見つかった。そこで、X線回折によりこれらの系の炭化水素鎖のパッキングを調べた結果、DC11PC、DC13PC、DC14PGのゲル-液晶相転移には中間相としてlo相が存在することがわかった。

研究成果の概要(英文)：The liquid ordered(lo) phase in cholesterol-free lipid bilayers has been searched using ultra-high-sensitivity DSC developed in our laboratory. Multiple heat anomalies were found near the gel to liquid-crystalline phase transition of diundecanoyl phosphatidylcholine (DC11PC), ditridecanoyl phosphatidylcholine(DC13PC) and dimyristoyl phosphatidylglycerol(DC14PG). The packing of hydrocarbon chains of the systems was investigated with X-ray diffraction. It was found that the lo phase existed as an intermediate phase near the gel to liquid-crystalline phase transition of DC11PC, DC13PC and DC14PG.

研究分野：ソフトマターの物理

キーワード：脂質二分子膜 秩序液体相

1. 研究開始当初の背景

生体膜は様々な種類の脂質、蛋白質、糖などで構成されている。これらの物質は生体膜中で一様に分布しているのではなく、スフィンゴ脂質とコレステロールは生体膜においてミクロドメインを形成することが明らかになっている。このミクロドメインは特定の蛋白質を選択的に取り込むので、生体膜中で蛋白質を運ぶ筏の役割を果たすと考えられて「脂質ラフト」と名付けられている。脂質ラフトは、膜輸送やシグナル伝達などの機能を発現する場として注目されており、精力的に研究が行われている。その結果、スフィンゴ脂質とコレステロールが形成する脂質ラフトは秩序液体相であることが明らかになったが、生体膜中にはその他にも多種多様な脂質が存在している。多種多様な脂質が生体膜中に存在する理由は理解できていないが、コレステロールを含まないジラウロイルホスファチジルコリン (DC12PC) のゲル-液晶相転移で中間相として現れる L_x 相は秩序液体相であるという我々の発見により、どのような脂質が秩序液体相を形成するかさえもよく分かっていないことが明らかとなった。その理由として、秩序液体相の形成に必要な要素がまだ分かっておらず、現在の生体膜の相転移のモデルでは単純な相互作用しか考慮されていないことが考えられる。

このような状況を考えると、現在の生体膜の研究で欠けているのは、秩序液体相の形成に関する実験的知見であると考えられる。秩序液体相の出現にはコレステロールが必要であると考えられてきたが、コレステロールがなくても炭化水素鎖の短いホスファチジルコリンでは秩序液体相が現れるという結果は、現在の生体膜の理論では予測できない。また、この結果は生体膜において秩序液体相が広範に存在する可能性を示唆しており、より詳細なモデルを構築するための実験的知見が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

生体膜における秩序液体相の形成にはコレステロールが必要であることが常識となっているが、我々はコレステロールを含まないリン脂質ホスファチジルコリン二分子膜でも鎖長が短い場合は秩序液体相が現れることを見出した。そこで本研究では、コレステロールを含まないリン脂質二分子膜において秩序液体相を探索し、秩序液体相の形成に必要な要素を実験的に明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) DC12PC で現れる L_x 相は、ホスファチジルコリン-コレステロール混合系で現れる秩序液体相と同じ炭化水素鎖の秩序が高い液晶相であることを示すために、我々が開発した X 線回折と高感度 DSC の同時測定装置によって DC12PC とホスファチジルコリン-コレス

テロール混合系の炭化水素鎖の構造を調べた。

(2) 我々が開発した超高感度 DSC を用いて、コレステロールを含まない脂質二分子膜の熱異常を測定し、秩序液体相 (l_o 相) を探索した。炭化水素鎖の短いリン脂質、極性頭部の大きなリン脂質を中心に、炭化水素鎖の長さ、極性頭部の種類の異なる脂質二分子膜のゲル-液晶相転移における熱異常を測定し、中間相の存在を示唆する熱異常が見つかった場合は、X 線回折により炭化水素鎖の構造を調べた。

4. 研究成果

(1) 図 1(a) に DC12PC の高感度 DSC の結果を示す。3.9 °C に $L-L_x$ 相転移と、-5 °C に主転移による熱異常が見られた。図 1(b) にコレステロールを 15 mol% 添加した DC14PC の DSC の結果を示す。22.9 °C に $L-l_o$ 相転移と、21.8 °C に主転移による熱異常が見られた。図 2 に X 線回折のプロファイルを示す。15 nm⁻¹ 付近の幅の広いピークは、炭化水素鎖による回折である。DC12PC では、 L 相より L_x 相の方がピーク位置が広角で、ピークは鋭くなった。DC14PC-コレステロール (15 mol%) でも L 相より L_x 相の方がピーク位置が広角で、ピークも鋭くなった。次に、炭化水素鎖による回折の面間隔 d を図 4 に示す。DC12PC の L_x 相の d は L 相よりも小さく、DC14PC-コレステロールの l_o 相の d も L 相よりも小さかった。どちらも同程度に炭化水素鎖がパッキングしており、秩序が高いことが分かった。ま

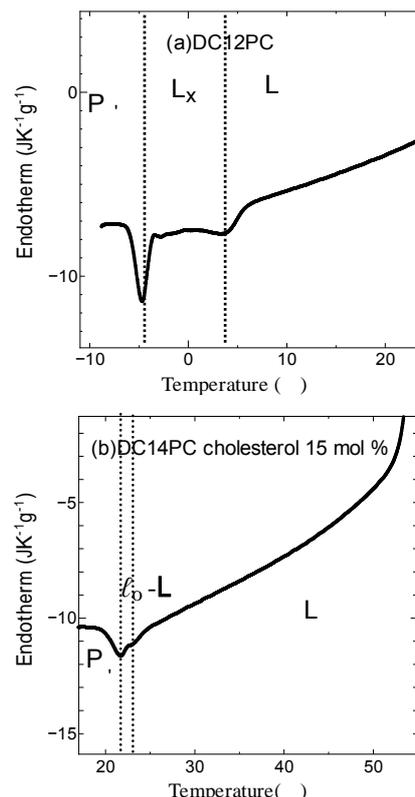


図 1. (a) DC12PC と (b) DC14PC-コレステロール (15mol%) の DSC 曲線

た、炭化水素鎖の回折の半値幅から求めた相関長は、 L_x 相、 l_0 相ともに 0.8 nm 程度であり、 L_x 相は l_0 相と同様に炭化水素鎖が秩序化した液晶相であることが分かった。

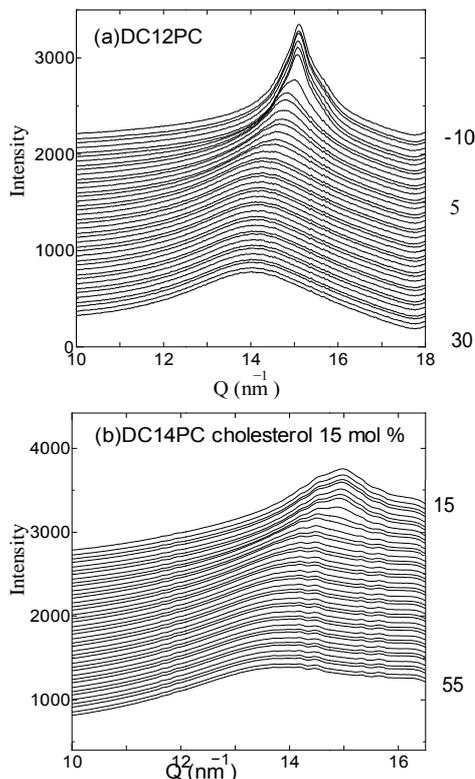


図 2. (a)DC12PC と (b)DC14PC-コレステロール (15mol%) の X 線回折像

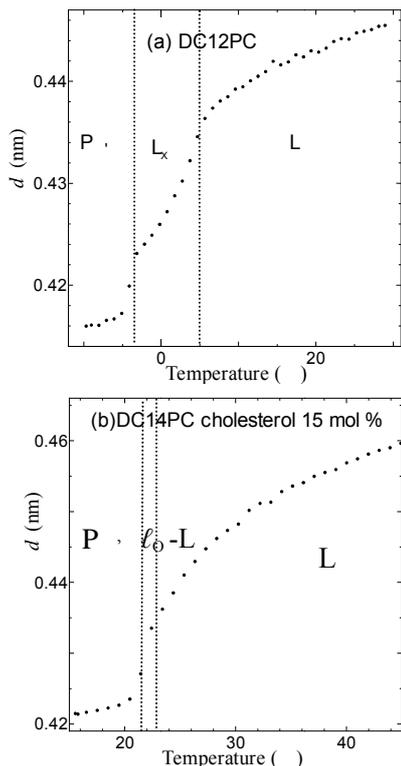


図 4. (a)DC12PC と (b)DC14PC-コレステロール (15mol%) のラメラ繰り返し周期

(2)DC12PC で秩序液体相が現れることから、炭化水素鎖長が短く、極性頭部の大きなリン脂質で秩序液体相 (l_0 相) が現れると期待される。そこで、DC12PC より炭化水素鎖が 1 個短いジアンデカノイルホスファチジルコリン (DC11PC)、1 個長いジトリデカノイルホスファチジルコリン (DC13PC)、2 個長いジミリストイルホスファチジルコリン (DC14PC)、3 個長いジペンタデカノイルホスファチジルコリン (DC15PC)、4 個長い 2 個長いジパルミトイルホスファチジルコリン (DC16PC) の熱異常を超高感度 DSC を用いて測定した。その結果、DC11PC、DC13PC で l_0 相が現れることが分かった。

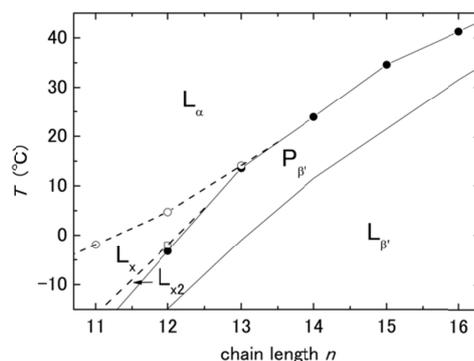


図 5. DCnPC の炭化水素鎖長と温度の相図

(3)ホスファチジルコリンより極性頭部が小さいジラウロイルホスファチジルエタノールアミン (DC12PE)、ジデカノイルホスファチジルエタノールアミン (DC10PE)、ジオクタノイルホスファチジルエタノールアミン (DC8PE)、極性頭部が大きく負の電荷を持ったジラウロイルホスファチジルセリン (DC12PS)、ジデカノイルホスファチジルセリン (DC10PS)、極性頭部が大きく負の電荷を持ったジラウロイルホスファチジルグリセロール (DC12PG) とジミリストイルホスファチジルグリセロール (DC14PG)、極性頭部が小さく正の電荷をもったジラウロイルホスファチジン酸 (DC12PA)、ジデカノイルホスファチジン酸 (DC10PA)、ジデカノイルホスファチジン酸 (DC8PA) などについて探索を行った。その結果、DC12PG、DC14PG、DC12PS のゲル-液晶相転移において複数の熱異常が認められた。図 6 に DC14PG の DSC 曲線を示す。これらの脂質について X 線回折実験を行った結果、DC14PG については秩序液体相 (l_0 相) が存在することがわかった。図 7 に DC14PG の X 線回折像を示す。測定は降温走査で行った。回折像は 44 から 9.3 まで等間隔にずらして示す。44 で $Q=14.2 \text{ nm}^{-1}$ にある幅の広いピークは 24.2 から高さが大きく、幅が小さくなり、ピーク位置も 14.5 nm^{-1} から 14.7 nm^{-1} へと移動した。さらに 21.4

以下では、ピークはより鋭く、非対称になり、位置は 15.0 nm^{-1} 付近へと移動した。これらの結果から、 $21.4\text{-}24.2$ に存在する中間相は炭化水素鎖の相関長が L 相より長く、パッキングが密な秩序液体相であることがわかった。

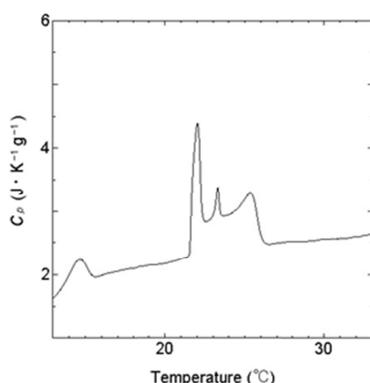


図 6. 超高感度 DSC による DC14PG の DSC 曲線

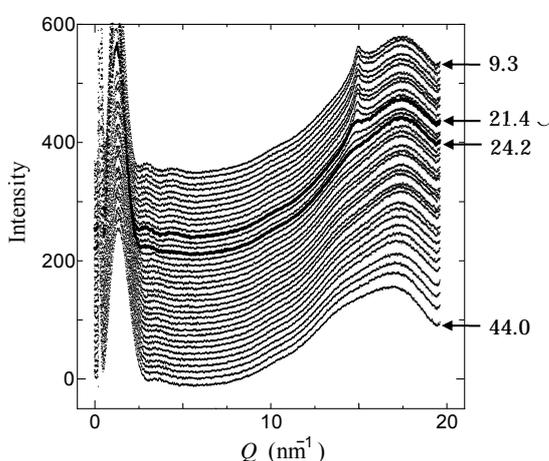


図 7. DC14PG の X 線回折像

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 5 件)

八尾晴彦、小牧裕之、三村賢人、神谷泰史、岡崎文洋、猿山靖夫、短鎖リン脂質ホスファチジルコリンの Lx 相、第 5 2 回熱測定討論会、2016 年 9 月 28~30 日、徳島大学常三島キャンパス(徳島県徳島市)

小牧裕之、神谷泰史、岡崎文洋、猿山靖夫、八尾晴彦、高感度 DSC と X 線回折の同時測定によるリン脂質ホスファチジルコリン-コレステロール混合系の Lx 相の研究、第 5 2 回熱測定討論会、2016 年 9 月 28~30 日、徳島大学常三島キャンパス(徳島県徳島市)

小牧裕之、神谷泰史、岡崎文洋、猿山靖夫、八尾晴彦、X 線回折と高感度 DSC の同時測定によるリン脂質ホスファチジルコリン-コレステロール混合系の Lx 相の研究、第 6 7 回

コロイドおよび界面化学討論会、2016 年 09 月 22 日、北海道教育大学旭川校(北海道旭川市)

小牧裕之、猿山靖夫、八尾晴彦、高感度 DSC と X 線回折の同時測定によるリン脂質ホスファチジルコリン-コレステロール混合系の Lx 相の研究、第 5 1 回熱測定討論会、2015 年 10 月 8~12 日、東京電機大学埼玉鳩山キャンパス(埼玉県比企郡)

小牧裕之、猿山靖夫、八尾晴彦、X 線回折と高感度 DSC の同時測定によるリン脂質ホスファチジルコリン-コレステロール混合系の Lx 相の研究、第 6 6 回コロイドおよび界面化学討論会、2015 年 9 月 10~12 日、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八尾 晴彦 (YAO, Haruhiko)
京都工芸繊維大学・材料化学系・准教授
研究者番号：60212271

(2) 研究分担者

猿山 靖夫 (SARUYAMA, Yasuo)
京都工芸繊維大学・材料化学系・教授
研究者番号：50162532

(4) 研究協力者

小牧裕之 (KOMAKI, Hiroyuki)
京都工芸繊維大学・材料制御化学専攻・大学院生

吉川悠樹 (YOSHIKAWA, Yuki)
京都工芸繊維大学・材料制御化学専攻・大学院生