

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410016

研究課題名(和文) 脂質膜のメカノアシンメトリー：圧力研究から見えてくる脂質分子非対称性

研究課題名(英文) Mechano-asymmetry of lipid membranes: lipid molecular asymmetry revealed from high-pressure study

研究代表者

松木 均 (Matsuki, Hitoshi)

徳島大学・大学院生物資源産業学研究部・教授

研究者番号：40229448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ホスファチジルコリン(PC)二重膜の力学的非対称性(メカノアシンメトリー)を明らかにするために、飽和非対称PC、1-ミリストイル-2-ステアロイルPC(MSPC)およびその位置異性体である1-ステアロイル-2-ミリストイルPC(SMPC)の形成する二重膜の相挙動を示差走査熱量測定、高圧光透過率測定および高圧蛍光プローブ測定から調査した。両非対称PC二重膜の各相(水和結晶相、ラメラゲル相、リップルゲル相および指組み構造ゲル相)の安定性は、アシル鎖末端部の差異に依存して顕著に変化し、PC分子内への非対称鎖の導入はPC二重膜の膜状態に顕著な影響を与えることを結論づけた。

研究成果の概要(英文)：To reveal the mechanical asymmetry of phosphatidylcholine (PC) bilayer membranes, bilayer phase behavior of saturated asymmetric phosphatidylcholines, 1-myristoyl-2-stearoyl-PC (MSPC) and its positional isomer 1-stearoyl-2-myristoyl-PC (SMPC), was investigated by methods of differential scanning calorimetry under atmospheric pressure and light transmittance and fluorescence measurements under high pressure. We proved that the stability of each phase of both asymmetric PC bilayer membranes, namely hydrated crystal phase, lamellar gel phase, ripple gel phase, and interdigitated gel phase, markedly changes depending on the mismatch at terminal methyl ends between the sn-1 and sn-2 acyl chains, and that the introduction of asymmetric chains to a PC molecule significantly affects the membrane states of the PC bilayer membranes.

研究分野：生物物理化学

キーワード：脂質膜 高圧力 相転移 指組み構造 非対称脂質 ホスファチジルコリン メカノアシンメトリー 膜内イメージング

1. 研究開始当初の背景

脂質膜研究において、これまで研究対象にされてきた脂質は、主に2本の疎水鎖が等しい分子構造を有する対称型グリセロリン脂質である。他方、実際の生体膜中には、グリセロール骨格の *sn*-1 位と *sn*-2 位に結合している疎水基鎖長が異なるものや両位置に異なる分子構造の疎水基が結合しているリン脂質も数多く存在する。例えば、ヒト赤血球膜に含まれるホスファチジルコリン(PC)のうち、*sn*-1 位に飽和脂肪酸(約 86%)および *sn*-2 位に不飽和脂肪酸(約 91%)を有する飽和不飽和非対称型PCの占める割合が全PC中の約 70%と圧倒的である。これに対して、対称型PCは全PC中の僅か 10%程度しか含有されていない。このように生体膜の真の主成分脂質は、非対称型リン脂質であることを考える時、その二重膜構造の形成機構や構造特性に関する知見を得ることは生体膜の機能解明に対して重要である。

脂質二重膜は、ゲル状態では脂質分子は縦方向に伸長(膜厚が増大)、横方向には収縮(膜面積が縮小)するが、液晶状態では縦方向に縮小(膜厚が縮小)、横方向には拡張(膜面積が増大)する。これは、元来、脂質膜の環境変数感受性は非等方的であることを示している。圧力は等方的且つ瞬時に作用するため脂質膜にメカニカルな大きなゆらぎをもたらす。従って、高圧力下では脂質膜は加圧下における安定配置を取ろうとして、その集合状態を変化させる。脂質分子内における疎水鎖の非対称性はこのゆらぎを増幅し、脂質膜物性にさらに大きな影響を与える。

2. 研究の目的

我々は、近年、疎水鎖や親水頭部といった分子構造の異なる種々の脂質が形成する二重膜の熱力学的研究を行い、温度-圧力相図や相転移熱力学量から、それらの相挙動を特徴づけてきた。その中で、非対称型脂質の二重膜が引き起こす相転移や様々な相状態の安定性は対称型リン脂質のものとは比べて顕著な差違があることを見出した。これらの研究を通してアシル鎖の非対称性が脂質膜物性に顕著な影響を与えることがわかったが、得られた知識は幾つかの比較的に非対称性が少ない脂質に対する断片的なものであり、脂質膜物性におよぼす鎖非対称性の統一的な解釈には至っていない。本研究においては、非対称型脂質が形成する二重膜の高圧力下における膜状態をさらに調査し、脂質膜の力学的非対称性(メカノアシンメトリー)を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

非対称型脂質として飽和アシル鎖間の非対称性が大きなPCである1-ミリストイル-2-ステアロイルPC(MSPC: C14C18PC)とその位置異性体である1-ステアロイル-2-ミリストイルPC(SMPC: C18C14PC)、および比

較対象として全炭素数が等しい飽和アシル鎖を有する対称型PCであるジパルミトイルPC(DPPC: C16PC)を選択した。

濃度 1 mmol kg^{-1} の脂質分散液を調製し、各PC二重膜の主転移温度以上において数分間の超音波処理後、冷蔵保存したものを測定に供した。ラメラ結晶(L_c)相の観測には、試料溶液に -30°C における1時間の冷凍処理後、 5°C における23時間の冷蔵処理を1サイクルとする熱的アニーリング処理を繰り返した試料溶液を用いた。

脂質膜相転移の観測は、常圧下では、示差走査熱量(DSC)測定で、高圧下では、高圧光透過率測定および極性膜プローブ Prodan を用いた高圧蛍光プローブ測定で行った。

4. 研究成果

本研究において用いた非対称型リン脂質(MSPC、SMPC)および対称型リン脂質(DPPC)のゲル相における分子構造を図1に示す。これら3種類のリン脂質のアシル鎖全炭素数は32で統一されているが、*sn*-2位鎖はC2-C3位で折れ曲がるため、*sn*-1位よりも若干短くなり、両鎖の末端メチル基の整列具合は異なっている。MSPC(*sn*-2位が長い)、SMPC(*sn*-1位が長い)、DPPCの順に*sn*-1位と*sn*-2位における末端部の炭素数が約2.5、5.5、1.5個分の差異(ミスマッチ)がある。

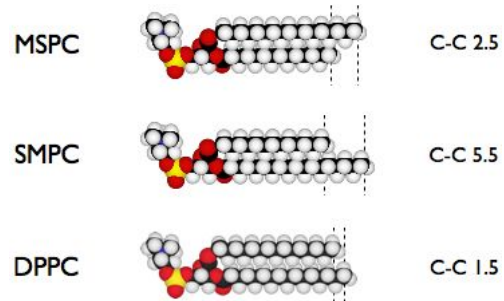


図1 非対称および対称PCの分子構造。

(1) 温度-圧力誘起相転移

MSPCおよびSMPC二重膜のDSCサーモグラムをDPPC二重膜のものと共に図2に示す。MSPCおよびSMPC二重膜においては、1度目の昇温過程においては、 L_c 相からリップルゲル(P_β')相への副転移、続いて P_β' 相から液晶(L_α)相への主転移を観測した。1度目の昇温過程後に直ちに昇温した2度目の昇温過程では、副転移は観測されず、代わりに出現するラメラゲル(L_β')相から P_β' 相への前転移と主転移を観測した。同様な挙動はDPPC二重膜でも観測され、DPPC二重膜の副転移は L_c/L_β' 転移であるという差異はあるものの、全てのPC二重膜において L_c 相の形成には時間を要することがわかった。

高圧力下における相転移を各圧力下において光透過法を用いて決定し、DSC測定において得られた相転移データと併せて、MSPC

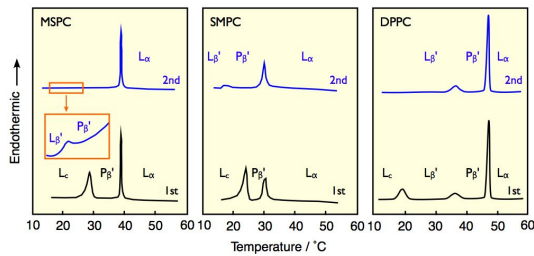


図2 非対称および対称 PC 二重膜の DSC サーマグラム。

および SMPC 二重膜の温度-圧力相図を作成した。結果の相図を DPPC 二重膜のものと共に図3に示す。3種類の相転移温度は加圧と共に上昇し、相転移温度の圧力依存性 (dT/dp) は前転移、副転移、主転移の順序で増大した。MSPC 二分子膜では約 110 MPa 以上で圧力誘起指組み構造ゲル ($L_{\beta I}$) 相を観測したが、SMPC 二分子膜では測定可能な圧力範囲 (0.1–350 MPa) において $L_{\beta I}$ 相は確認できなかった。DPPC 二重膜の相図と比較してみると、MSPC および SMPC 二重膜においては、 L_{β} 相は熱履歴に依存して完全に準安定相として存在するが、DPPC 二重膜では、 L_{β} 相は熱履歴に依存せず、安定相として存在することが明確になった。

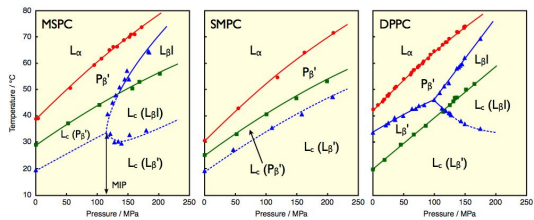


図3 非対称および対称 PC 二重膜の温度-圧力相図。

(2) 相転移熱力学量

DSC 測定からの熱的相転移データおよび高圧光透過率測定から得られた dT/dp 値から決定した MSPC および SMPC 二重膜の相転移熱力学量 (エンタルピー (ΔH)、エントロピー (ΔS)、体積 (ΔV)) を対応する DPPC 二重膜のものと共に表1に挙げる。

主転移における熱力学量値は DPPC > MSPC > SMPC の順序となり、アシル鎖末端ミスマッチが大きいほど P_{β} 相は不安定となった。この事実は、ミスマッチの大きさに比例して P_{β} 相中の分子充填が弱められることに起因する。前転移における MSPC 二重膜の熱力学量値は著しく低い値となった一方で、SMPC 二重膜では、熱力学量値は非対称 PC 二重膜としては大きな値となり、DPPC 二重膜のものに匹敵した。この理由については、現在のところ定かでは無い。副転移における熱力学量値は、非対称型 PC 二重膜では、DPPC 二重膜の約 2 倍以上の顕著に高い値を

示した。これまで、対称型 PC 二重膜が L_c 相を形成する際には、極性基頭部が膜面より互い違いに上下にずれたスタッガード構造をとることが示唆されている。非対称型 PC 二重膜が L_c 相を形成する場合、先端部のミスマッチに起因して同構造をより取りやすくなり、安定な L_c 相を形成するものと推察した。

表1 非対称および対称 PC 二重膜の相転移熱力学量

Lipid	Trans.	Temp.	dT/dp	ΔH	ΔS	ΔV
		°C	K MPa ⁻¹	kJ mol ⁻¹	J K ⁻¹ mol ⁻¹	cm ³ mol ⁻¹
MSPC	P_{β}/L_{α}	38.8	0.21	38.1	122	25.6
SMPC	P_{β}/L_{α}	30.9	0.20	27.8	91	18.2
DPPC	P_{β}/L_{α}	41.8	0.22	42.2	134	29.5
MSPC	L_{β}/P_{β}	18.9	0.13	0.4	1.4	0.2
SMPC	L_{β}/P_{β}	18.5	0.12	4.6	16	1.9
DPPC	L_{β}/P_{β}	35.3	0.13	6.7	22	2.9
MSPC	L_c/P_{β}	29.1	0.14	50.9	168	23.6
SMPC	L_c/P_{β}	25.2	0.14	51.9	173	24.3
DPPC	L_c/L_{β}	21.5	0.18	26.0	88	15.9

(3) 二重膜内イメージング

図4に温度-圧力相図上に示した昇温線に沿って行った高圧蛍光プローブ測定に基づいて構築したこれら PC 二重膜の膜状態に関するイメージマップを示す。DPPC 二重膜のイメージプロットには4種類の谷が見られ、低温から L_{β} 相、 $L_{\beta I}$ 相、 P_{β} 相および L_{α} 相に対応している。一方、MSPC 二重膜 (アニーリング非処理) では低温下 (約 20°C) で観測された L_c 相が昇温に伴い、約 30°C で指組みラメラ結晶 (L_{cI}) 相を形成した。その後は約 57°C で P_{β} 相へと転移し、約 78°C で L_{α} 相に転移した。MSPC 二重膜の L_c 相形成は著しく速く、且つ加圧によりその形成がさらに促進され、アニーリング非処理でも L_c 相が出現した。一般に $sn-2$ 位のアシル鎖が $sn-1$ 位より長い飽和非対称 PC の二重膜は、より安定な L_c 相を形成することから二重膜内においてスタッガード構造に移行しやすと考えられる。他方、SMPC 二重膜では、加圧しても結晶化および指組み構造化は起こらず、ゲル

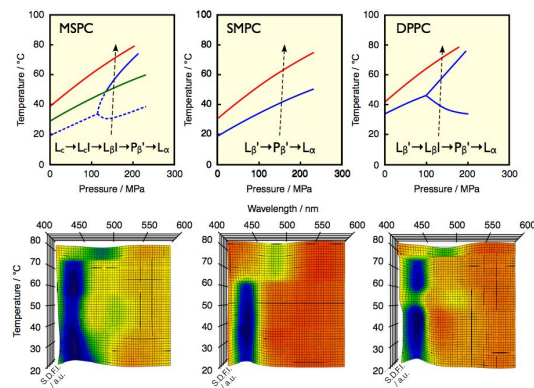


図4 非対称および対称 PC 二重膜の膜状態イメージング。

相から L_c 相への変化のみが見られた。表 1 の副転移熱力学量に見られるように、SMPC 二重膜も MSPC 二重膜と同様に非常に安定した L_c 相を形成することから、両 PC 二重膜の L_c 相形成は速度論的に大きな差があることをイメージマップから明確にできた。

(4) 圧力誘起指組み構造形成

$L_{\beta I}$ 相に関しては、DPPC 二重膜の最小指組み構造化圧力 (MIP) 値は 100 MPa であるのに対して MSPC 二重膜の MIP 値は 113 MPa となり、SMPC 二重膜の $L_{\beta I}$ 相形成は測定圧力範囲では認められなかった。また、疎水鎖非対称性が大きいことから、部分型あるいは混合型指組み構造が高圧力下で起こることを期待したが、 $L_{\beta I}$ 相を観測した MSPC 二重膜では完全型混合指組み構造であった。図 5 に、対称型 PC 二重膜における完全型の指組み構造化の模式図と、これまでに調査してきた対称型および非対称型 PC 二重膜の MIP 値を、アシル鎖非対称度を規準化した鎖長非透過定数 ($\Delta C/CL$) に対してプロットした図を示す。ここで、 $\Delta C/CL$ 値が大きいほど非対称度が高いことを意味する。アシル鎖炭素数が等しい (ミスマッチが 1.5) 対称型 PC 二重膜の $\Delta C/CL$ 値はほぼ等しく、中央に描かれた 1 本の曲線となり、鎖長増加に伴い MIP 値は低下する。アシル鎖炭素数が 2 つ異なる非対称型 PC (ミスマッチが 0.5 および 3.5) 二重膜の $\Delta C/CL$ 値は対称型 PC 二重膜の左右に引いた直線上に位置する。ミスマッチが 2.5 の MSPC 二重膜の MIP 値は、ミスマッチが 1.5 と 3.5 の PC 二重膜の間に位置し、ミスマッチが 5.5 の SMPC は図の範囲外となった。上記の結果は、MIP 値は 2 本のアシル鎖末端部分の凝集力を反映した物理量であることを意味しており、アシル鎖末端の整列による van der Waals 力の増大が $L_{\beta I}$ 相形成のし易さの主要因であることを示唆している。

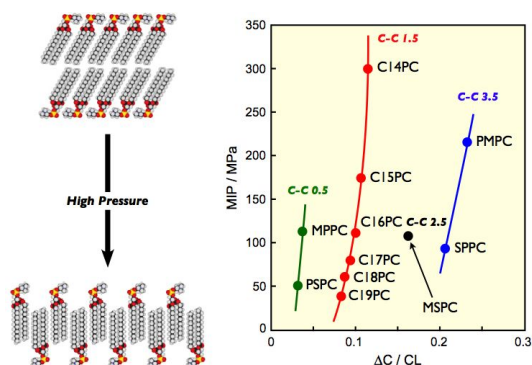


図 5 対称 PC 二重膜における圧力誘起指組み構造化の模式図および鎖長非透過定数と最小指組み構造化圧力の関係。

以上より、PC 分子内への非対称鎖の導入はアシル鎖末端部のミスマッチにより、PC 二重膜の相状態に大きな影響を与えることを結論づけた。現在、ミスマッチのさらに大

きな非対称型 PC の有機合成を研究室で試みており、近い将来、異なる形式の圧力誘起指組み構造形成を調査する予定である。

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)

[雑誌論文](計 11 件)

M. Goto, Y. Aoki, N. Tamai, H. Matsuki, Effect of pressure on bilayer phase behavior of *N*-methylated di-*O*-hexadecylphosphatidylethanolamines: relevance of head-group modification on the bilayer interdigitation, *Biophysical Chemistry*, 査読有, 2017, in press

H. Matsuki, S. Endo, R. Sueyoshi, M. Goto, N. Tamai, S. Kaneshina, Thermotropic and barotropic phase transitions on diacylphosphatidylethanolamine bilayer membranes, *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes*, 査読有, 1859, 2017, 1222-1232

M. Goto, T. Endo, T. Yano, N. Tamai, J. Kohlbrecher, H. Matsuki, Comprehensive characterization of temperature- and pressure-induced bilayer phase transitions for saturated phosphatidylcholines containing longer chain homologs, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 査読有, 128, 2015, 389-397

松木 均, 後藤優樹, 玉井伸岳, 脂質膜の圧力誘起指組み構造形成: 疎水鎖長依存性と形成限界, *材料*, 査読有, 63, 2014, 620-623

松木 均, 後藤優樹, 玉井伸岳, 飽和ジアシルホスファチジルコリン二重膜の温度および圧力誘起相転移, *熱測定*, 査読有, 41, 2014, 66-73

など

[学会発表](計 67 件)

松木 均, 山下翔子, 後藤優樹, 玉井伸岳, 飽和ジアシルホスファチジルエタノールアミン二重膜の温度および圧力誘起相転移, 第 67 回コロイドおよび界面化学討論会 (北海道教育大学旭川分校 (北海道旭川市)), 2016 年 9 月 22 日)

M. Goto, N. Tamai, H. Matsuki, Effect of pressure on bilayer phase behavior of *N*-methylated di-*O*-hexadecylphosphatidylethanolamines, 9th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2016), (Toronto University (Toronto, Canada), July 27, 2016)

後藤優樹, 玉井伸岳, 松木 均, 非対称飽和アシル鎖を有するホスファチジルコリンの温度および圧力誘起二重膜相転移, 第 53 回生物物理学会年会 (金沢大学角間キャンパス (石川県金沢市)), 2015 年 9 月 13 日)

矢野貴大, 後藤優樹, 玉井伸岳, 松木 均, リン脂質二分子膜の圧力誘起相転移 - 非対称飽和アシル鎖をもつホスファチジルコリン -, 第 55 回高圧討論会 (徳島大学常三島キ

キャンパス(徳島県徳島市), 2014年11月22日) 同討論会ポスター賞受賞

松木 均, 後藤優樹, 玉井伸岳, リン脂質二重膜の圧力および化学誘起指組み構造化: 形成機構の相違, 第52回生物物理学会年会(札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)) 2014年9月27日
など

〔図書〕(計 7件)

M. Goto, N. Tamai, H. Matsuki, Bilayer Imaging of Phosphatidylcholines by High-Pressure Fluorometry, Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science, Vol. 2, (Ed. H. Ohshima), Wiley STM, Hoboken, NJ, 2016, 1200 (860-869)

松木 均, 後藤優樹, 玉井伸岳, 金品昌志, リン脂質二重膜の圧力誘起膜融合: 巨大単層ベシクルの球形成長, 高压バイオサイエンスとバイオテクノロジー, (野村一樹, 藤澤哲郎, 岩橋 均 編集), 三恵社, 名古屋, 2015, 155 (117-121)

K. Akasaka, H. Matsuki, High Pressure Bioscience – Basic Concepts, Applications and Frontiers, Springer Science + Business Media B. V., Dordrecht, 2015, 730

松木 均, 生体膜と圧力, 極限環境の生体分子 (CSJカレントレビュー第17号), 日本化学会編, 化学同人, 京都, 2014, 178 (95-102)
など

〔その他〕

ホームページ等

徳島大学生物資源産業学部応用生命コース
C1 研究室

<http://www.bio.tokushima-u.ac.jp/A1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松木 均 (MATSUKI HITOSHI)

徳島大学・大学院生物資源産業学研究部・
教授

研究者番号: 40229448

(2) 研究分担者

玉井 伸岳 (TAMAI NOBUTAKE)

徳島大学・大学院生物資源産業学研究部・
准教授

研究者番号: 00363135

後藤 優樹 (GOTO MASAKI)

徳島大学・大学院生物資源産業学研究部・
助教

研究者番号: 30507455

(平成27年5月21日より追加)