



Title	非線形振動分光法によるリン脂質二分子膜の構造評価
Author(s)	叶, 深
Citation	分光研究, 54(2), 109-110 https://doi.org/10.5111/bunkou.54.109
Issue Date	2005
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/52239
Type	journal article
File Information	54_109.pdf



トピックス

非線形振動分光法による
リン脂質二分子膜の構造評価

北海道大学触媒化学研究センター 叶 深

生体膜は、脂質二分子膜を二次元溶媒として、これに様々な機能性タンパク質が“溶けて”いる構造をしている(流動モザイクモデル)。脂質二分子膜の構造性と機能性の関係を解明することは、細胞生物学における重要な研究課題である。一般的に、脂質分子の膜面内での側方拡散および膜を横切る縦方向の移動、いわゆるフリップ・フロップ運動が、細胞膜の機能性発現やリン脂質の非対称分布の維持に重要な役割を担っていると考えられている。しかしこれまでの研究では、主に色素で標識した脂質分子の運動について調べられてきたが、修飾された脂質分子は、生体膜にある活性脂質分子と化学的にも構造的にも大きく異なるため、分子レベルでの直接の観察が期待されている。

近年、和周波発生(SFG)は、その高い界面選択性と測定感度の故に注目を集めている¹⁻³⁾。SFGは二次非線形光学効果に基づく現象であり、周波数 ω_{vis} と ω_{IR} の二光子から、それらの周波数の和($\omega_{\text{SFG}} = \omega_{\text{vis}} + \omega_{\text{IR}}$)の一光子への変換過程である。SFGは中心対称性をもつ物質のバルクでは発生せず、中心対称性が壊れる界面においてのみ発生するため、界面・表面に極めて敏感である。特に入射光の一つを赤外領域に置くことにより、種々の界面の振動スペクトルが高感度で得られる。

最近、Utah大学のConboyらは、熔融石英基板と水の界面において、リン脂質分子の1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-diheptadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DHPC) および 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC) またはその重水素置換体を用い、LB法によりそれぞれの単一脂質分子二分子膜を作製し、そのフリップ・フロップ運動や相転移温度についてSFG振動分光法により直接的な評価を試みた^{4,5)}。

図1に、一層目をDSPC、二層目をDSPC-*d*₈₃で作製した二分子膜の重水中におけるSFGスペクトルを示す⁴⁾。C-H伸縮領域(2750~3100 cm⁻¹)で測定したため、内層であるDSPC分子の構造について選択的に測定できる。2875, 2938と2960 cm⁻¹に強く観測されたピークはDSPCの脂肪酸アルキル鎖末端にあるCH₃基のC-H対称伸縮、Fermi共鳴と非対称伸縮によるものである。それに対して、CH₂基の対称伸縮が2948 cm⁻¹に弱く観測されていることから、DSPCは*all-trans*の状態で配列したことが分かった。ConboyらはこのCH₃基の対称伸縮振動のSFG強度(I_{CH_3})の時間変化を指標として、脂質二分子膜におけるフリップ・フロップ運動の速度を測定した。図2に示

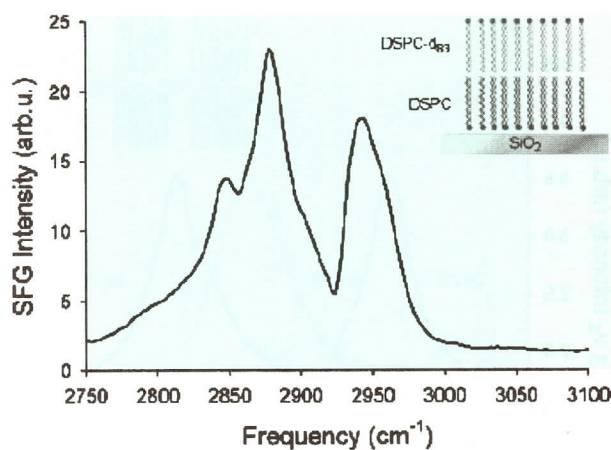


図1 24°Cで観測されたDSPC/DSPC-*d*₈₃二分子膜のSFGスペクトル。右上に模式図を示す。

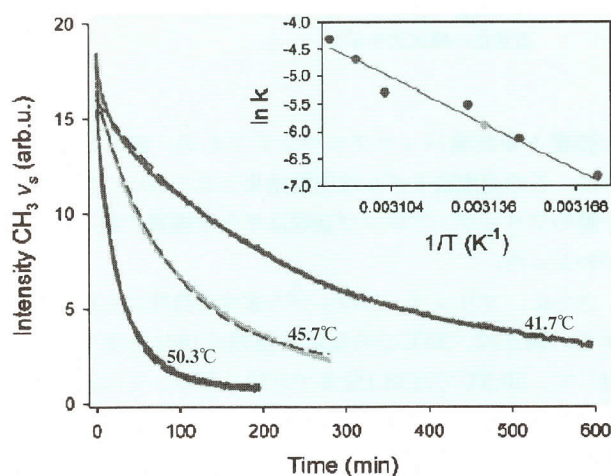


図2 各温度で観測された I_{CH_3} の時間依存性である。右上に速度定数($\ln k$)と温度逆数の関係を示す。

すように、 I_{CH_3} は時間とともに指数的に減衰した。 I_{CH_3} は二分子膜内に存在するDSPC分子の数及びその配向に依存するので、以下の関係が成立する。

$$I_{\text{CH}_3} \propto (N_T - N_B)^2 \quad (1)$$

ここで N_T と N_B は二分子膜の外層と内層にあるDSPC分子のモル分率で、 $N_T + N_B = 1$ である。また、外層と内層にあるDSPC分子の配向が逆である初期状態においては、 $N_T = 0$, $N_B = 1$ であるが、フリップ・フロップ運動とともに内層のDSPCが外層へと移動し、平衡状態($N_T = N_B = 0.5$)に達するまで拡散し続ける。それに伴い二分子膜の非対称性が低下し、 I_{CH_3} が減少する。ここで、DSPCのフリップとフロップの速度が同じである単分子反応とすると、反応速度式は

$$I_{\text{CH}_3} = I_{\text{max}} \exp(4kt) + I_{\text{nr}} \quad (2)$$

となる。ここで k は速度定数、 I_{max} と I_{nr} はSFG信号の最

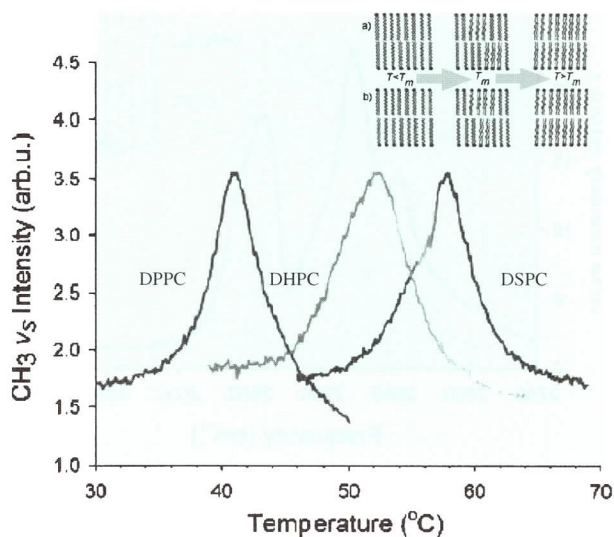


図3 DPPC, DHPC および DSPC 単一二分子膜で観測された I_{CH_3} の温度依存性である. 右上に T_m 前後の膜構造変化の模式図を示す.

大強度と非共鳴バックグラウンドである. 図2に示すように, この速度論モデルは実験結果とよく合い, 脂質二分子膜のフリップ・フロップ過程は単分子機構で起こることがわかった.

さらに, フリップ・フロップの速度は温度にも強く依存する. 例えば, 25°Cでの反応半減期は18日を要するのに対して, 50.3°Cでは38.1分までと短くなる. この過程の活性化エネルギーは $206 \pm 18 \text{ kJ/mol}$ と求められた. 一方, 温度上昇に伴い, 脂質二分子膜は相転移温度 (T_m) 付近でゲル相から液晶状態 (LC) へと構造変化を起こすことが, 示差走査熱量分析 (DSC) により知られている. この状態変化と上記フリップ・フロップ過程の関連についても検討された.

図3には, DPPC, DHPC と DSPC の単一脂質二分子膜を基板表面に作製し, 溶液の温度を $0.2^\circ\text{C}/\text{分}$ の速度で上昇させた際, その場で観測された I_{CH_3} の温度依存性を示す⁵⁾. いずれの膜でも強い温度依存性を示し, $41.0 \pm 0.4^\circ\text{C}$ (DPPC), $52.4 \pm 0.7^\circ\text{C}$ (DHPC) および $57.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (DSPC) に SFG 強度の最大値が観測された. これまでに報告された各脂質分子の T_m の文献値と近いことが分かった. すなわち, T_m 以下では, 脂質分子はゲル相として存在し, 対称性により二分子膜から SFG ピークは基本的に観測されないと期待されるが, ここで弱く観測されたこと (図3) は, 膜内に欠陥が存在していること, または石英基板に接

する内層と重水に接する外層との環境の違いにより, 対称性が一部崩されていることを示唆した (著者の研究グループでは, この場合では殆ど信号を観測していないことをここで記したい)^{6,7)}. 一方, T_m において, 脂質分子の協同的相転移が起こり, 脂質二分子膜のゲル状態と LC 状態のドメイン転位および内層・外層のドメインサイズの違いにより, 膜の局所対称性が破壊され, SFG 強度の著しい増加が観測された. さらに, T_m 以上の温度範囲では, 均一相の LC の形成により, 二分子膜の対称性が増え, SFG 強度が再び減少に転じた (図3模式図). このことから, I_{CH_3} の温度依存性を測定することにより, これまで DSC では測定できなかった固体基板に担持した脂質二分子膜の T_m を測定できることを示した. この研究から脂質分子を基板表面に固定しても T_m がさほど大きく変わらないことが分かった⁵⁾.

さらに, DSPC/DSPC- d_{83} で作製した非対称二分子膜で同じ測定を行ったところ, フリップ・フロップ過程は T_m より低めの温度で急激に加速され, T_m において, フリップ・フロップはすでに平衡状態に達した⁴⁾. また, 実際の細胞膜には多くの脂質分子があるため, 転位温度の範囲も相当広いものと予想される.

以上に示したように, SFG 振動分光法は, リン脂質二分子膜のフリップ・フロップ過程及び相転移過程の直接観察に適用し, 成功を収めた. 今後, 生化学や細胞生物学の研究へのこの手法の活用が大きく期待されるところである⁷⁻⁹⁾.

参考文献

- 1) Y. R. Shen: The Principles of Nonlinear Optics. ed.: John Wiley & Sons, Inc.: New York (1984).
- 2) 和田昭英, 堂免一成, 廣瀬千秋: 分光研究 **47**, 190-199 (1999).
- 3) 叶 深, 大澤雅俊: 表面科学 **24**, 740-746 (2003).
- 4) J. Liu and J. C. Conboy: J. Am. Chem. Soc. **126**, 8376-8377 (2004).
- 5) J. Liu and J. C. Conboy: J. Am. Chem. Soc. **126**, 8894-8895 (2004).
- 6) S. Ye, H. Noda, T. Nishida, S. Morita, and M. Osawa: Langmuir **20**, 357-365 (2004).
- 7) T. Nishida, H. Noda, S. Ye, and M. Osawa: *submitted*.
- 8) C. Ohe, Y. Ida, S. Matsumoto, T. Sasaki, Y. Goto, M. Noi, T. Tsurumaru, and K. Itoh: J. Phys. Chem. **B 108**, 18081-18087 (2004).
- 9) M. Bonn, S. Roke, O. Berg, F. Juurlink, A. Stamouli, and M. Muller: J. Phys. Chem. **B 108**, 19083-19085 (2004).