

博 士 論 文

ホスホリパーゼ C を用いたリン脂質単分子膜の物性研究

2015 年 3 月

静岡県立大学大学院 薬学研究科 製薬学専攻

博士後期課程 生命物理化学分野

長島 輝芳

Reproduced with permission from Nagashima, T.; Hashimoto, H.; Fujii, S.; Uematsu, S.
Langmuir **2015**, *31*, 1479–1488; Nagashima, T.; Hashimoto, H.; Fujii, S.; Uematsu, S.
Langmuir **2015**, *31*, 5014–5014. Copyright 2015 American Chemical Society.

博 士 論 文

ホスホリパーゼ C を用いたリン脂質単分子膜の物性研究

本論文は静岡県立大学大学院薬学研究科博士論文である

2015 年 3 月

静岡県立大学大学院 薬学研究科 製薬学専攻

博士後期課程 生命物理化学分野

長島 輝芳

Study of physical properties of phospholipid monolayers using
phospholipase C

March, 2015

Teruyoshi NAGASHIMA

略語および語句の定義

a	simulated phosphocholine concentration
a_0	initial POPC concentration
AFM	atomic force microscopy
ALP	alkaline phosphatase
CCD	charge-coupled device
C-Cl	choline chloride
COD	choline oxidase
DAG	diacylglycerol
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DPPC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
E	elastic modulus
FM	fluorescence microscopy
FT-IR	Fourier transform infrared
G	gas
HRP	horseradish peroxidase
LB	Langmuir–Blodgett
LS	Langmuir–Schaefer
L1	liquid-expanded
L2	liquid-condensed
OTS	octadecyltrichlorosilane
π -A	surface pressure–area
PC	phosphatidylcholine
P-Cl	phosphocholine chloride calcium salt tetrahydrate
PLA ₂	phospholipase A ₂
PLC	phospholipase C
PLC _A	PLC adhering to membrane
PLC _F	free PLC
PLC _P	PLC penetrating membrane
POG	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycerol
POPC+PLC	POPC monolayers hydrolyzed by PLC
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
R18	octadecyl rhodamine B
t	elapsed time of PLC reaction
t_{lag}	time-lag of PLC reaction
TC	tilted-condensed
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride

緒言	1
第一章 POPC 単分子膜における PLC 加水分解反応の速度論的解析	5
序論	5
1.1 実験方法	6
実験試料および使用機器	7
表面圧測定	8
PLC による POPC 単分子膜の加水分解反応	9
ルミノール増強化学発光法によるホスホコリンの定量	9
PLC 加水分解反応の解析	11
POPC 単分子膜の π -A 等温曲線の測定	12
POPC 単分子膜の弾性率解析による膜の相解析	12
蛍光顕微鏡による POPC 単分子膜の構造観察	13
1.2 結果	14
POPC 単分子膜における PLC 加水分解反応の表面圧依存性	14
π -A 等温曲線および膜弾性率による POPC 単分子膜の膜相転移の解析	18
蛍光顕微鏡を用いた POPC 単分子膜の構造観察	19
1.3 考察	21
第二章 リン脂質/ジアシルグリセロール混合膜の膜相分離	23
序論	23
2.1 実験方法	24
試料	24
脂質単分子膜の π -A 等温曲線	24
POPC/POG 混合単分子膜の π -A 等温曲線測定	24
LB 法を用いた脂質膜の調製	25
AFM による脂質 LB 膜の観察	26
2.2 結果	27
脂質単分子膜の π -A 等温曲線比較	27
POPC/POG 混合単分子膜の π -A 等温曲線の圧縮速度による影響	28
AFM による脂質 LB 膜の観察	29
2.3 考察	31
第三章 脂質ナノドメインにおける加水分解反応と生成物 POG のドメイン形成	32
序論	32
3.1 実験方法	33
LS 法を用いた POPC 膜の調製	33
POPC の LS 膜表面への断面形成	33
加水分解された POPC の LS 膜調製	34
AFM による POPC の LS 膜の観察	34
3.2 結果	36

POPC の LS 膜の断面解析	36
加水分解された POPC の LS 膜の AFM 観察による表面解析	38
3.3 考察	40
第四章 POPC 単分子膜の稠密化による親水性表面の構造変化	41
序論	41
4.1 実験方法	42
POPC の LS 膜調製	42
AFM による POPC の LS 膜の表面観察	42
4.2 結果	43
AFM による POPC の LS 膜の表面解析	43
4.3 考察	45
考察	46
POPC 単分子膜における PLC 加水分解反応の表面圧依存性	46
POPC 単分子膜の膜構造と PLC の反応機構	46
脂質単分子膜におけるナノドメインとナノサイズの膜相分離	49
酵素反応場として脂質凝縮膜のナノドメイン	49
ナノサイズ脂質膜の膜相分離	50
パッキングによる酵素の脂質膜への侵入阻害	51
酵素反応と水	52
総括	54
謝辞	56
参考文献	58

緒言

脂質分解酵素は基質特異性を有し、その多くが脂質/水の界面上で基質となる脂質分子と反応する。リパーゼ及びホスホリパーゼは脂質/水の界面で反応する加水分解酵素の典型的な例である。それらの基質特異性は基質の化学構造だけでなく基質を含有する脂質膜構造にも基づいている。例えば、リン脂質を加水分解するホスホリパーゼ C (PLC) により作られるセカンドメッセンジャーのジアシルグリセロール (DAG)¹ の機能を解明するには脂質膜の物理化学的特性に基づいた研究が必要である。そのような脂質/水の界面における膜機能を明確にするため脂質単分子膜中の酵素反応のさまざまなモデルが提案されている。Verger と共同研究者はホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) を使用してリン脂質単分子膜の分解速度を解析し脂質表面での酵素加水分解反応の速度論的モデルを提案した。^{2,3} しかし、彼らは酵素反応生成物が全て可溶化する実験条件を念頭に置いたため彼らの用いたリン脂質は短鎖の脂肪酸側鎖 (炭素鎖 8 から 12) である。生体膜に含まれるリン脂質では炭素鎖 16 や 18 の脂肪酸側鎖が最も多いので生体膜上の酵素反応に対して彼らのモデルを適応できるかは不明である。Grainger らは落射蛍光顕微鏡法により PLA₂ がホスファチジルコリン (PC) 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) の単分子膜中の液体拡張 (L1) 膜と液体凝縮 (L2) 膜の境界に反応していることを観察し酵素反応が脂質膜の膜構造に依存することを示した。⁴ しかし、測定温度が DPPC の相転移温度より低いため L1 膜から分離した結晶状の L2 膜の限られた膜状態における結論となっている。このため通常の液晶状態にある脂質膜および生体膜にこの結果を適応できない。さらに、Rao と

Damodaran は脂質単分子膜中のタンパク質の吸着と脂質分解酵素の活性が界面の水分活性に関連していることも提案した。⁵⁻⁸ 彼らの用いた脂質は脂肪酸側鎖が短い分子(炭素鎖 10 と 12) であるか、分解物が相分離する分子だった。これらの理由のため、相分離しない脂質の単分子膜について上記モデルが適用できるのかよく分かっていない。例えば、1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) の単分子膜は蛍光リン脂質プローブを用いた落射蛍光測定では $21 \pm 2^\circ\text{C}$ で単一の均一な蛍光相を示し⁹ $30^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ で相分離を示さない¹⁰ ので、室温では L1 膜として解釈されている。POPC 単分子膜に対する *Clostridium perfringens* 由来の PLC による加水分解反応が報告されており、¹¹ 酵素は POPC 単分子膜よりもジアシルグリセロール (DAG) 単分子膜に対して高い親和性を示すことが明らかにされている。一方、X 線回折研究に基づいて、¹² 単分子膜構造と相転移は疎水性アシル鎖の傾きと親水性頭部基の双方の観点から理論的に明らかにされた。しかしながら、POPC 単分子膜が測定温度において液晶状態にあるため POPC 単分子膜の X 線回折による規則的な膜構造は報告されていない。このような理由によって基質を含有した脂質膜、酵素、反応生成物およびその脂質膜構造について明確なモデルが未だ明らかにされていない。

本稿では、細胞膜上での酵素反応および生理反応を考察する目的で脂質膜の加水分解反応の詳細を脂質膜の構造、反応後の脂質膜の構造変化、反応生成物の膜溶解性等の点から解析した。実験対象としてリン脂質 POPC の単分子膜およびそれに反応する *Bacillus cereus* 由来の酵素 PLC を使用した。PLC による POPC の加水分解反応の模式

図を Figure 1 に示す。

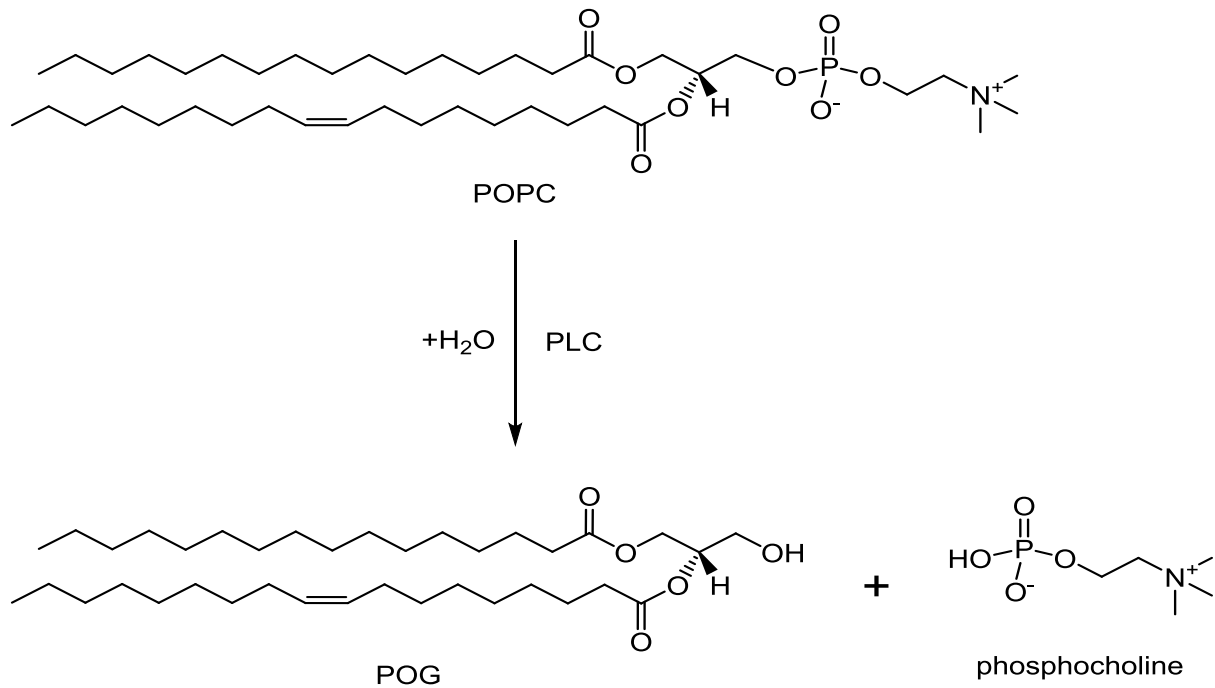


Figure 1. Hydrolysis of POPC by PLC.

第一章では、単分子膜の初期表面圧と酵素活性の関係を解析した。ルミノール増強化学発光法を用いた反応生成物ホスホコリンの定量に基づく POPC の加水分解率解析により単分子膜の加水分解反応の初期表面圧依存性および加水分解反応の至適膜表面圧を確認した。単分子膜の表面圧-面積 (π -A) 等温曲線を測定し、膜弾性率を解析して膜相転移を調べた。蛍光顕微鏡 (FM) により POPC 単分子膜の相状態や構造を観察した。

第二章では、基質 POPC、反応生成物 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerol (POG)、酵素 PLC の物性、これら三つの物質の相互作用、および膜相転移を調べ、膜反応モデルについ

て研究した。POPC 単分子膜、POG 単分子膜、および PLC 反応後の POPC 単分子膜の π -A 等温曲線を測定し比較した。POPC/POG 9:1 (mol/mol) の混合単分子膜の π -A 等温曲線を測定し圧縮速度の影響と脂質分子の相溶性を解析した。POPC 単分子膜および POPC/POG 9:1 (mol/mol) の混合単分子膜の Langmuir-Blodgett (LB) 膜を調製し、原子間力顕微鏡 (AFM) により脂質膜の疎水面構造を検証した。

第三章では、酵素反応が進行する POPC 単分子膜の親水性表面を解析した。至適表面圧で PLC を反応させたときの POPC 単分子膜の Langmuir-Schaefer (LS) 膜を調製した。LS 膜表面に断面を作製して PLC 反応時の LS 膜の親水面の膜厚変化を AFM により解析した。断面作製しない PLC 反応時の LS 膜を調製し、その親水面の経時変化を AFM により解析した。

第四章では、種々の表面圧で調製した POPC 単分子膜の LS 膜を作製した。LS 膜の親水性面構造を AFM により観察し、PLC 反応の表面圧依存性との関連を解析した。

考察では、第一章から第四章までの結果に基づき POPC 単分子膜に対する PLC 反応のモデルを提案した。脂質ナノドメインの相分離、界面の水、および膜流動性との関係から POPC 単分子膜に対する PLC 反応について考察した。

第一章 POPC 単分子膜における PLC 加水分解反応の速度論的解析 序論

第一章では、リン脂質を加水分解する酵素 PLC の反応について基質のリン脂質単分子膜を用いて研究を行い細胞膜上での酵素反応を推論した。単分子膜とは分子が一層に並んだ膜のことである。用いたリン脂質単分子膜は水面上に広がったリン脂質の膜である。この場合の水はサブフェーズと呼ぶ下層液である。酵素は *Bacillus cereus* 由来の PLC を、リン脂質は POPC を使用した。加水分解生成物のホスホコリンの量はルミノール増強化学発光法を用いて定量した。POPC 単分子膜の各初期表面圧で PLC 反応による POPC の加水分解率を解析して反応速度定数を得た。PLC 加水分解反応が単分子膜の初期表面圧に依存することを確認した。PLC 加水分解反応が単分子膜の初期表面圧に依存した理由を明らかにするため単分子膜の表面圧-面積 (π -A) 等温曲線を測定した。等温曲線は単分子膜を圧縮してその面積を減少させた時の表面圧変化から求めた。等温曲線から算出した膜弾性率 E 値の解析および POPC 単分子膜の FM 観察により単分子膜の相転移と相を決定した。

1.1 実験方法

装置の概略図を Figure 2 に示す。

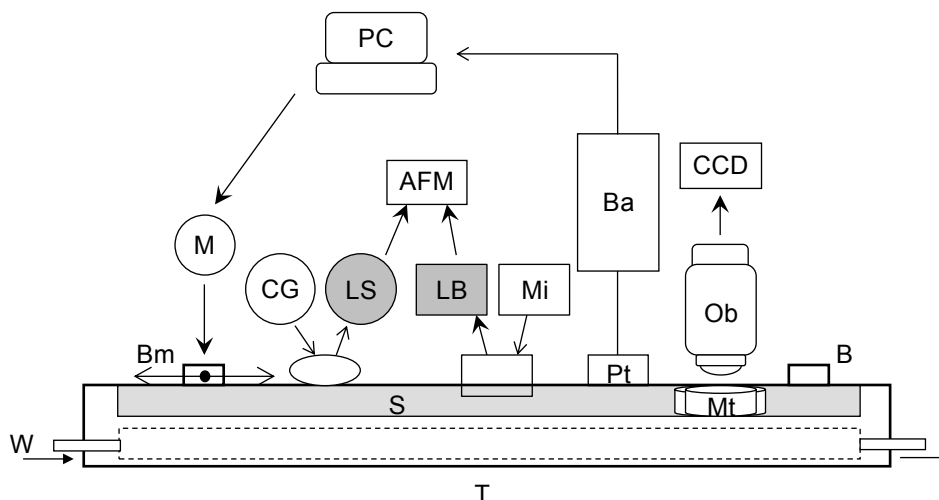


Figure 2. Diagram of the apparatus for measurement of monomolecular film and microscopy.

T, brass trough covered with Teflon; S, subphase, capacity of $18 \times 13 \times 0.5 \text{ cm}^3$ (length, width, and depth, respectively), except for fluorescence microscopy (FM) with $20 \times 10 \times 0.5 \text{ cm}^3$, respectively; Mt, Teflon micro-trough connected to subphase by 2 mm channel, 7 mm inside diameter; Bm, moving brass bar covered with Parafilm; B, brass bar covered with Parafilm; Pt, platinum plate of $2.4 \times 1 \times 0.02 \text{ cm}^3$ (length, height, and width, respectively); Ba, electronic balance (Mettler AE240, Mettler-Toledo International Inc.); M, stepping motor controlling Bm; PC, personal computer measuring area and surface pressure while controlling Ba and M; Mi, freshly cleaved mica; LB, Langmuir-Blodgett film to which monolayer adheres; CG, cover glass treated with OTS; LS, Langmuir-Schaefer film to which monolayer adheres; AFM, atomic force microscopy; Ob, objective lens of fluorescence microscope, magnification $10\times$; CCD, charge-coupled device for Nikon microscopes; and W, water from thermostatic water bath at $25 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$, except for FM ($25 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$).

実験試料および使用機器

本研究室でリン脂質 POPC と DPPC を卵黄レシチン¹³ から合成し¹⁴ 中性アルミナとシリカゲルのクロマトグラフィーで精製した。ガスクロマトグラフィーを用いて、POPC の脂肪酸組成を同定した。Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO, USA) から PLC を購入しそのまま使用した。蛍光プローブは本研究室で octadecyl rhodamine B (R18) を合成した。¹⁵ TLC により、脂質および蛍光プローブの純度が 99% を超えていることを確認した。二度蒸留クロロホルムで脂質 (0.3 mM) および蛍光プローブ (0.1 mM) の保存溶液を調製し、その溶液を二重蓋のガラス瓶 (Gas Chromatographic Capsule, GSK Type, 桐山製作所、東京) 中に $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存した。

使用した水は初めに蒸留水製造装置 Eyela SA-2100E (東京理化学工業株式会社、東京) を用いて蒸留した後、大健石英硝子株式会社 (東京) の非沸騰型蒸留装置を用いて再蒸留した。毎回の実験前に表面の掃引および油回転真空ポンプ G-5D (アルバック機工株式会社、西都市) に接続したチューブでのサブフェーズ溶液の吸引により残っている界面活性不純物を除去した。¹⁶ 塩化ナトリウム (NaCl)、塩化カルシウム二水和物 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、および水酸化ナトリウム (NaOH) は和光純薬工業株式会社 (大阪、日本) から購入した。実験前に NaCl は $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 1 時間加熱し他の二つの塩はそのまま使用した。トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン塩酸塩 (Tris-HCl) はメルク (ダルムシュタット、ドイツ) から購入しそのまま使用した。すべての単分子膜の実験は以下の標準緩衝液を用いて行った: 30 mM Tris-HCl、138 mM NaCl、5 mM CaCl_2 、および pH 7.4。サブフェーズの温度を $25.0 \pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ で一定に保った。

標準緩衝液に溶解した濃度 1.8 U/mL の PLC の一定分量を実験直前に調製して同じ日の実験で使用した。

表面圧測定

Wilhelmy プレート法により表面圧 π (mN/m) を測定し以下のように定義する：

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

ここで γ_0 は気液界面の表面張力であり γ はパッキング密度を変化させて圧縮した脂質単分子膜の存在下での表面張力の値である。つまり、表面圧とはサブフェーズのみの表面張力と単分子膜を作製したときの表面張力の差を取ったものである。Wilhelmy プレート法は表面張力を測定する手法の一つである。測定子であるプレートが液体の表面に触れた時の力のつり合いから表面張力を測定する。本研究ではサブフェーズ溶液に緩衝液を用いたので、 γ_0 の値は水の表面張力 73 mN/m を用いた。 γ は以下の式で計算される：

$$\gamma = \frac{F}{l \cdot \cos \theta}$$

ここで F は張力、 l はプレートの外周、 θ はプレートと液相との接触角である。 $F = mg$ であり、プレートが完全に濡れているとき $\theta = 0^\circ$ である。 m は質量で、 g は重力加速度である。Figure 2 に示すように、表面張力 γ は化学天秤 AE240 (Mettler-Toledo、東京) に取り付けられた薄い白金板 (外周、4.84 cm ; 協和界面科学 (株)、新座市) を使用して測定した質量から求めた。二重底トラフ (表面、13×18 cm² ; 深さ、0.5 cm) を真鍮で作りその表面を静電塗装によりテフロンでコーティングした。表面積調整用と表面圧測定用

のバリアの移動をパソコンで制御した。木製の容器内に備え付けたトラフの温度を一定温度で水を循環させることにより制御した。

PLC による POPC 単分子膜の加水分解反応

100 μL シリンジで POPC 溶液 (0.3 mM、100 μL) をサブフェーズ上に広げ、20 分間待って溶媒を蒸発させた。POPC 単分子膜を目的の表面圧 (2、5、10、15、17、および 20 mN/m) まで圧縮した。膜表面圧の安定を確認した後 PLC 溶液 100 μL を単分子膜下の緩衝液中に注入した。膜表面圧に影響が出ないように単分子膜の下部をスターラーバーで慎重に攪拌した。PLC 注入後の表面圧変化を 90 分間測定した。

ルミノール増強化学発光法によるホスホコリンの定量

POPC 単分子膜における PLC 加水分解反応の反応速度は反応生成物を定量する方法により加水分解反応を解析した。加水分解反応生成物の一つであるホスホコリンの量 (fmol) をルミノール増強化学発光法により 90 分間測定した。

東京化成工業株式会社 (東京) からルミノールを購入し、結晶化のため室温で 1 M NaOH に溶解した。活性炭処理後、その化合物を 4 $^{\circ}\text{C}$ で 3 回再結晶し、ルミノールナトリウム塩として実験に使用した。Sigma-Aldrich から 4-Iodophenol を購入しそのまま使用した。旭化成ファーマ株式会社 (東京) から贈与された *Arthrobacter globiformis* 由来のコリンオキシダーゼ (COD) と *Escherichia coli* 由来のアルカリホスファターゼ (ALP) をそのまま使用した。Sigma-Aldrich から西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼ

(HRP、タイプ VI) 及びホスホコリンクロリドカルシウム塩四水和物 (P-Cl) を購入しそのまま使用した。和光純薬から塩化コリン (C-Cl) を購入しそのまま使用した。

POPC 単分子膜における PLC 反応の間、PLC 注入後所定の時間でマイクロピペットを用いて 500 mL のサブフェーズ溶液から 1.3 mL 採取した。蓋付きの 3 mL 試験管中に溶液 0.6 mL と 0.1 M NaOH 100 μ L を混合し pH を 8.2 に調整した。その後 ALP 100 μ L を試験管に添加し酵素-基質混合液を 37 °C で 2 時間インキュベートした。その後 Table 1 に示すようにマイクロシリンジを用いてルミノール溶液 0.3 mL を 1.2 mL のテフロンセルへ添加した。1 分後酵素-基質混合溶液 0.3 mL を別のマイクロシリンジを用いてセルへ注入した。窒素置換下 25 °C で化学発光分析装置 OX-7 (東北電子工業株式会社、仙台市) を用いて溶液の化学発光の積算値を測定した。ノイズの問題を回避するため注入 5 秒後化学発光を測定した。P-Cl および C-Cl 双方の溶液を用いて化学発光の検量線を得た。全ての試料および酵素を実験前に調製しこれらの溶液を同じ日の実験で使用した。

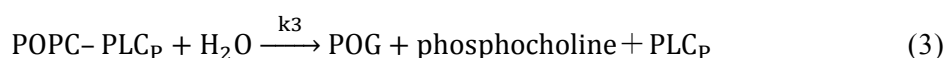
Table 1. Luminol solution composition

material	concentration	volume	final concentration ^a
Luminol	3.6×10^{-5} M	2 mL	1.2×10^{-5} M
4-Iodophenol	3.6×10^{-4} M	2 mL	1.2×10^{-4} M
HRP	12 U/mL	1 mL	2 U/mL
COD	30 U/mL	1 mL	5 U/mL

^aTotal volume, 6 mL.

PLC 加水分解反応の解析

脂質単分子膜に対する酵素の加水分解反応機構は Verger と共同研究者によって報告されている。^{2,3} その報告に基づくと、POPC 単分子膜からのホスホコリン生成機構は以下の (1) 侵入、(2) 複合体形成、及び (3) 加水分解から説明される。



最初のプロセスは、サブフェーズ中の PLC が“PLC_p”として単分子膜に侵入していることを表現し、第二のプロセスは PLC_p と POPC が“POPC-PLC_p”という膜内複合体を形成することを表現し、そして第三のプロセスは POPC-PLC_p 複合体が分解されることを表現する。素反応 (1) は水相と脂質相の間で起こる反応であるため脂質構造によりその活性化エネルギーが変化することが予想できる。これに対し素反応 (2) および (3) は膜の中で進行する反応であることから脂質膜構造による活性化エネルギーへの影響は素反応 (1) より少ないことが予想される。

ホスホコリンの生成速度が律速の加水分解プロセスに依存する場合 k₃ が律速であるため反応を擬一次反応として解析する。

$$a = a_0 \left[1 - e^{-k(t-t_{\text{lag}})} \right] + \alpha$$

ここで a は経過時間 t に対してホスホコリンの濃度をシミュレーションした値、 a_0 が POPC の初期濃度、および k は反応速度定数である。 t_{lag} は PLC 反応のタイムラグで酵素添加後に擬一次反応が開始するまでの時間である。

POPC 単分子膜の π -A 等温曲線の測定

POPC 単分子膜の π -A 等温曲線を測定し、その物性を分析した。ここで、 π -A 等温曲線とは温度一定で単分子膜の面積を変化させた時の表面圧変化を求めたものである。100 μ L シリンジで POPC 溶液 (0.3 mM、100 μ L) をサブフェーズ上に広げ、20 分間待って溶媒を蒸発させた。温度を 25 $^{\circ}$ C で一定にして POPC 単分子膜を圧縮し分子専有面積が減少したときの表面圧変化を測定した。POPC 単分子膜の圧縮速度は 10 $\text{\AA}^2/\text{molecule}/\text{min}$ とした。

POPC 単分子膜の弾性率解析による膜の相解析

POPC 単分子膜の圧縮に伴う単分子膜の膜相転移と相の種類を調べるため単分子膜の膜弾性率を解析した。以前の研究では圧縮によって誘導される等温曲線中の相転移を分子専有面積に関する表面圧の微分係数で分析していた。¹⁷ 本研究では以下のように所定の表面圧における圧縮弾性率(E) (単位: mN/m (E)) の値を π -A 等温曲線のデータから得た：

$$d\pi_T = -\frac{E}{A_\pi} dA_T$$

ここで A_π は表示表面圧 π における一分子あたりの面積である。従来の方法では測定した π -A 等温曲線の値を読み取り上記の式から E 値を算出していた。本研究では、所定の表面圧における圧縮面積 (dA_T) を一定に保つことで圧縮による膜への歪を一様にした。この測定法の改善により安定な π -A 等温曲線が測定されてさらに膜弾性率 E 値の

算出も容易になった。測定で得た POPC 単分子膜の π -A 等温曲線を分子専有面積に関する表面圧の微分係数で分析し単分子膜の相転移点を解析した。

蛍光顕微鏡による POPC 単分子膜の構造観察

POPC 単分子膜の FM 画像から単分子膜の構造および相を検証した。小さなバイアル瓶中に POPC 溶液を 100 μ L 入れて蛍光プローブ R18 を最終濃度 0.1 mol % となるよう加えた。この POPC/R18 混合溶液をトラフに注いだ緩衝液上にシリンジで展開した。FM 観察のための小さいテフロンコーティングトラフ (表面 $10 \times 20 \text{ cm}^2$ で深さ 0.5 cm) を正立顕微鏡の固定ステージ上に配置した (ニコン、東京、モデル Optiphot-2)。顕微鏡には 100 W の水銀ランプ (EFD2)、DM580 G-2A フィルターキューブ、および Fluor 10 \times の対物レンズを搭載した (Figure 2)。この設定と手法は同様の過去に記載されている手法に従った。¹⁸ ニコンの DS-5MC CCD カメラで画像を記録した。単分子膜の表面流動を除去するため、円形テフロントラフ (直径、26 mm ; 内径、7 mm ; 高さ、5 mm) を顕微鏡対物レンズ下のサブフェーズに挿入した (Figure 2)。¹⁹ 溶媒蒸発のため 20 分間静置した後、圧縮速度 $1 \text{ \AA}^2/\text{molecule}/\text{min}$ で POPC 単分子膜を段階的に圧縮し観察および画像の記録を行った。

1.2 結果

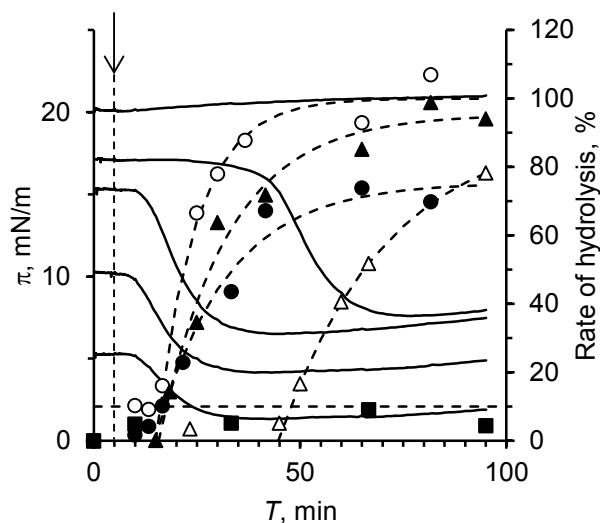
POPC 単分子膜における PLC 加水分解反応の表面圧依存性

PLC 反応による POPC 単分子膜の表面圧変化および加水分解産物ホスホコリン量から解析した膜の加水分解率の変化の結果を Figure 3a に示した。Figure 3a の点線の曲線は擬一時反応の式に従いシミュレーションしたホスホコリンの濃度から求めた POPC の加水分解率を示す。シミュレーションにより得られた反応速度定数および脂質の初期濃度を Table 2 に示した。PLC 反応により膜表面圧は低下し加水分解率は増加した。PLC 注入後、表面圧 5、10、および 15 mN/m では約 5 分間表面圧が変化せず一定だった。この状態では PLC が上記の式 (1) で示した最初のプロセスの後で単分子膜に侵入したことによる膜の稠密化に基づく現象が起きていると考えられる。その後表面圧が減少し、3 つの加水分解反応のタイムラグは全て約 10 分である (Table 2)。表面圧 10 mN/m では k の値と POPC の加水分解量の双方が最高値を示した。初期表面圧 17 mN/m で擬一次反応の開始は上記 3 つの初期表面圧における加水分解反応と比較してタイムラグが 4 倍の約 40 分である。しかしながら、POPC は 90%以上加水分解され反応速度定数の値は僅かに減少しただけだった。初期表面圧 20 mN/m では、タイムラグが 90 分を超え加水分解反応が開始しなかった。さらに、初期表面圧 2 mN/m では加水分解反応は検出されなかった。これらの POPC 単分子膜に対する PLC 反応の初期表面圧依存性の結果を別の表現で言い換える。1 cm²当たりの脂質分子数で表すと、 1.00×10^{14} 個 (2 mN/m) のリン脂質分子の濃度では反応せず、 1.16×10^{14} 個 (5 mN/m) から 1.47×10^{14} 個 (15 mN/m) の濃度で反応は進行する。さらに、 1.56×10^{14} 個 (17 mN/m) で反応が遅

くなり、 1.61×10^{14} 個 (20 mN/m) で反応が停止することを表している。つまり、脂質膜への酵素反応は脂質膜濃度の上昇によって進行したり停止したりする。しかし、その脂質濃度の比率は 1 から 1.6 倍の範囲で、Verger と共同研究者が提案する (1)、(2)、および (3) のカスケード反応式からは不連続でタイムラグを持つ加水分解反応を予想できない。^{2,3}

加水分解反応はタイムラグの前に進む前反応とタイムラグの後に進む後反応から構成されていた。Figure 1a に示すように POPC 分子が約 10%加水分解されるまで（横の点線より下の領域）のゆっくりした反応が前反応であり、初期表面圧から表面圧が少し減少した。タイムラグ後の後反応は擬一次反応として進行した。この後反応では膜表面圧は前反応と同様に減少した。Figure 1a に示すように、加水分解率 10%を超える（横の点線より上の領域）と加水分解率が急激に増加した。タイムラグ後の加水分解反応は爆発的に進行したことが示唆される。膜脂質の約 10 mol %の変化によって後反応の進行が制御されていることが予想された。

(a) Hydrolysis reaction



(b) POPC

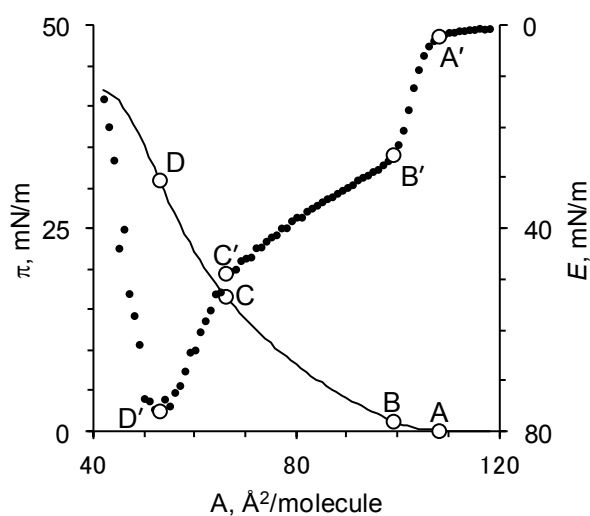


Figure 3. (a) Hydrolysis reactions in POPC monolayers at 25 °C by PLC. Solid lines indicate changing surface pressure after PLC injection. Rates of hydrolysis analyzed by phosphocholine concentrations: closed circles (5 mN/m, initial surface pressure), open circles (10 mN/m), closed triangles (15 mN/m), open triangles (17 mN/m), and closed squares (20 mN/m). Dotted curved lines are results of simulation of the pseudo-first-order reaction. The arrow and dotted vertical line shows PLC injection time (5 min). (b) π - A isotherm and E values in a monolayer: solid curved line, π - A isotherm in monolayer; closed circles, E values in monolayer; open circles, phase transition points; points A-D, phase transition based on inflection points of E values (A'-D').

Table 2. Hydrolysis Reaction and State of POPC Monolayer

monolayer properties	surface pressure (mN/m)								
	6×10^{-2}	1.3	2	5	10	15	17	20	31
initial concentration, ^a %	0	—	0	75	100	95	92	0	0
k , $\times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	—	—	ND ^b	5.8	10	6.0	3.8	ND	ND
t_{lag} , min	—	—	ND	10	10	11	40	>90	ND
π after t_{lag} , mN/m	—	—	ND	4.1	7.8	13	15	ND	ND
POG concentration at t_{lag} , %	—	—	ND	6.6	12.3	3.0	5.0	ND	ND
E , mN/m	0.4	25	28	33	40	47	50	58	76
phase	G	G/L1	L1	L1/L2	L1/L2	L1/L2	L2	L2	collapse
phase transition point	A	B					C		D

^aPercentage in contrast with POPC hydrolysis at 10 mN/m. ^bND, not detected.

π -A 等温曲線および膜弾性率による POPC 単分子膜の膜相転移の解析

上記結果で示された POPC 単分子膜に対する PLC 反応が表面圧に依存する理由を確かめるため、POPC 単分子膜の π -A 等温曲線について解析した。POPC 単分子膜の等温曲線は滑らかで (Figure 3b、実線の曲線) 相転移が不明確なため、単分子膜の膜相転移は膜の硬さを表す膜弾性率 E 値の解析によって決定した (Figure 3b、黒点)。弾性率 E 値には 4 つの変曲点が現れ次のように相転移点として分類した: (A') G 相から G/L1 相、(B') G/L1 相から L1 相、(C') L1 相から L2 相、及び (D') 崩壊。ここで G 相は気体相、L1 相は液体拡張相、そして L2 相は液体凝縮相である。X 線解析の定義によれば、L1 相では親水性頭部基も疎水性側鎖も無秩序な状態で、L2 相では疎水性側鎖が整列した状態である。¹² 膜弾性率 E 値中の点 A'-D' は等温曲線中の点 A-D と対応した。生体膜として重要な液体膜の状態は POPC 単分子膜では表面圧 2 から 31 mN/m (A-D) で膜弾性率 E 値は 0.4 から 76 mN/m (E) (A'-D') を示した。

蛍光顕微鏡を用いた POPC 単分子膜の構造観察

等温曲線で解析した POPC 単分子膜の相状態を確認するため、FM による観察を行った。POPC 単分子膜の FM 画像を Figure 4 に示した。FM 画像の明るい領域では蛍光プローブ R18 の可溶化と単分子膜の流動性が保たれていることを示す。単分子膜中に暗い部分の G 相と明るい部分の L1 相の共存を確認した (Figure 4a)。表面圧 >2 mN/m で均一な明るい画像を単分子膜は示した (Figure 4b-d)。これらの実験条件下で L1 相と L2 相のいずれでも相分離を観察せず過去の報告例と一致した。^{9,10} FM による観察では蛍光プローブによらず POPC 単分子膜の構造は均一で相分離が観測できないと結論付けた。単分子膜の FM 画像の結果に基づくと 25 °C で POPC アシル鎖の運動性は保たれていて L1 相から L2 相への変化により蛍光プローブの膜への溶解度は変化しない。

比較のため、L1 相から L1/L2 相への相転移を起こすことがよく知られている DPPC 単分子膜の、^{4,18} 本研究室で観察した FM 画像を Figure 5 に示す。POPC 単分子膜と同様に、G/L1 相を確認した (Figure 5a)。表面圧 1.6 mN/m では均一な明るい画像を単分子膜中に観察した (Figure 5b)。表面圧 10.3 mN/m では、POPC 単分子膜とは異なり明るい領域と暗い領域の双方の共存を確認した (Figure 5c)。明るい領域は上記のように流動性が高く R18 プローブが可溶化する L1 相であり、暗い領域は流動性が低く R18 プローブがほとんど存在しない L2 相である。表面圧 19.3 mN/m では L2 相が成長し大きくなった (Figure 5d)。DPPC の L2 相は内径 20–50 μm の大きさに観測された。この L2 相と同様な構造は固体状態の DPPC ドメインとして報告されている。^{4,18} Figure 5d に示すように表面圧が高い状態ではドメインが大きくなった。単分子膜の X 線解析の

定義に基づく、¹² この時の DPPC 単分子膜の状態は脂肪酸側鎖が傾いて配向した (tilted condensed、 TC) 状態であると予想される。

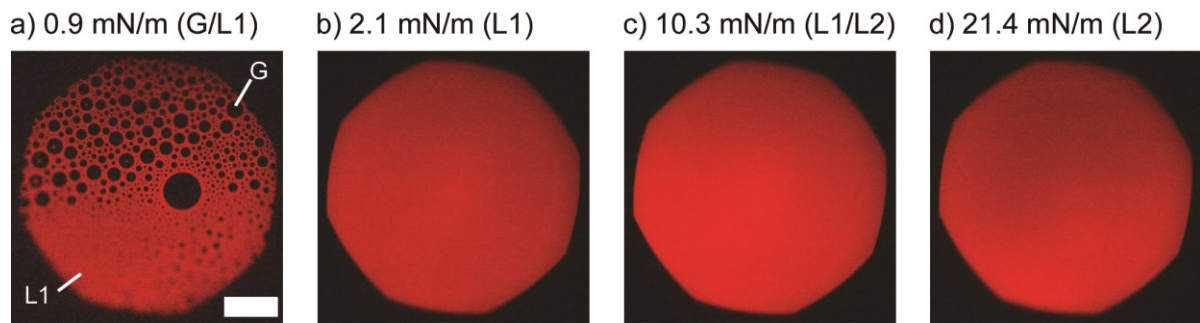


Figure 4. FM images of POPC monolayers that included 0.1 mol % R18 at varying surface pressures at 25 °C: (a) 0.9 mN/m (G/L1 phase), (b) 2.1 mN/m (L1 phase), (c) 10.3 mN/m (L1/L2 mixed phase), and (d) 21.4 mN/m (L2 phase). Scale bar, 200 μ m.

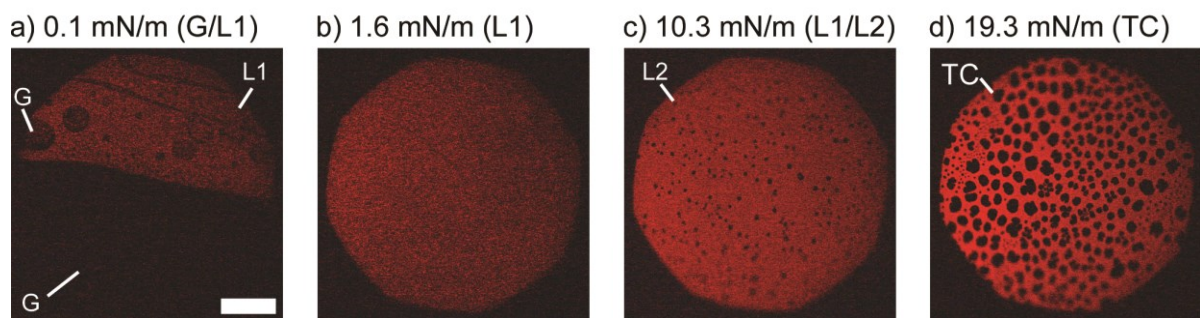


Figure 5. FM images of DPPC monolayers that included 0.1 mol % R18 at varying surface pressures at 25 °C: (a) 0.1 mN/m (G/L1 phase), (b) 1.6 mN/m (L1 phase), (c) 10.3 mN/m (L1/L2 mixed phase), and (d) 19.3 mN/m (TC phase). Scale bar, 200 μ m.

1.3 考察

上記の結果に基づき最終的に L1 相と L2 相の間の相転移および相を決定した。まず、L1 相を二つの相に分けた。膜弾性率の解析結果 (Table 2) は、膜表面圧 2 mN/m から 17 mN/m の範囲の単分子膜は L1 相に対応することを表す。しかし、初期表面圧 5、10、および 15 mN/m の単分子膜は加水分解され、初期表面圧 2 mN/m の単分子膜では加水分解されなかった。それゆえ L1 相は二つの異なる下位の相として分割した。興味深いことに、5 mN/m の初期表面圧における加水分解により表面圧が <2 mN/m まで減少してホスホコリン量が増加し POPC の加水分解は ~75% に達した。タイムラグ後のホスホコリン量の連続的な増加は、たとえ表面圧が低下したとしても加水分解反応の途中で PLC-脂質複合体が維持されることを示した。

次に、表面圧 17 mN/m で、以下に示すような二つの現象を異なる実験で観察した: (1) 加水分解反応において、反応速度が低下しタイムラグが増加したこと、(2) 膜弾性率 E 値の解析により、表面圧 17 mN/m で変曲点が現れた。この変曲点が L2 相への相転移点であると予想した。

いくつかの研究はその L2 相についての仮説を支持する。Kulovesi らは膜弾性率 E 値と同様の解析方法を用いて卵由来の PC (主成分は POPC) 単分子膜で 20 mN/m 未満で相転移が現れたと報告した。²⁰ Huynh らは POPC 単分子膜の分子動力学法によるシミュレーションにより 300 K で表面圧 15 mN/m 以上で極性頭部基の二つの配向が共存することを報告した。²¹ 一方は親水性頭部基の P 原子と N 原子を結ぶベクトルが界面に平行である。もう一方はコリン基が水側に向いた配向である。これらの報告された現

象は X 線回折の実験により得られた凝縮相の情報に類似していた。¹² これらの報告と本研究の結果に基づいて、L2 相では POPC 単分子膜中で親水性頭部基がパッキングしたと考えられる。ただし、Figure 4 に示すように POPC 単分子膜の相分離は観測されなかった。それゆえ、POPC 単分子膜は DPPC 単分子膜 (Figure 5) とは異なりアシル鎖は配向せず結晶化しないで熱運動していると推測される。

最後に、表面圧 2 mN/m から 17 mN/m の間の POPC 単分子膜の相転移と相について示す。上記単分子膜の FM 画像は明るい均一な画像で液晶状態の特徴を示した。さらに、酵素反応も進行した。上記の結果に基づくと、上記表面圧を示す POPC 単分子膜の相は L1 相と L2 相の混合相または中間相である。従って、その相を“L1/L2 相”と名付けた。また、酵素反応が観測されなかった表面圧 2 mN/m の脂質膜の相を L1 相と決定した。最終的に得られた POPC 単分子膜の膜相転移点と相を Table 2 に示した。

第二章 リン脂質/ジアシルグリセロール混合膜の膜相分離 序論

第一章では、生体膜として重要な液晶状態は POPC 単分子膜では表面圧 2 から 31 mN/m であると示唆された。その液体膜状態では Table 2 に示すように L1、L1/L2、および L2 相三種類の相が存在すると予想された。表面圧 2 mN/m の POPC 単分子膜の相を L1 相と決めた。17 mN/m 以上の表面圧では POPC 単分子膜の相を L2 相と決めた。表面圧 2 から 17 mN/m では POPC 単分子膜の相を L1 相と L2 相の間の中間相または混合相の L1/L2 相と決めた。L1/L2 相で進行した PLC 反応はタイムラグ前の最初の反応と擬一次反応で表された二番目のタイムラグ後の反応とから成る二つの反応過程から成っていた。第二章では、Figure 3a に示すように POPC が約 10 mol %加水分解された後、二番目の反応が急激に進行する理由を解明するため、加水分解反応の生成物である DAG の POG の特徴を詳細に検討した。

2.1 実験方法

試料

POPC は第 1 章で合成した脂質を用いた。粗 POG は PLC を用いた POPC の加水分解により得た。²² PLC は第 1 章で用いたものを使用した。得られた粗 POG をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。蛍光プローブは Lambda Probes & Diagnostics (Graz, Austria) から DiI を購入しそのまま使用した。TLC により、脂質および蛍光プローブの純度が 99%を超えていることを確認した。二度蒸留クロロホルムで脂質 (0.3 mM) および蛍光プローブ (0.1 mM) の保存溶液を調製し、その溶液を二重蓋のガラス瓶 (Gas Chromatographic Capsule, GSK Type、桐山製作所、東京) 中に -20°C で保存した。

標準緩衝液は第一章で作製したものを使用した。標準緩衝液に溶解した濃度 1.8 U/mL の PLC の一定分量を実験直前に調製して同じ日の実験で使用した。

脂質単分子膜の π -A 等温曲線

反応生成物の POG 単分子膜と基質である POPC 単分子膜の π -A 等温曲線とを比較した。さらに、PLC によって加水分解された POPC の単分子膜 (POPC+PLC) の π -A 等温曲線を測定し、酵素 PLC と反応生成物 POG の親和性を検証した。等温曲線の測定は第一章の方法に従った。

POPC/POG 混合単分子膜の π -A 等温曲線測定

POPC/POG 9:1 (mol/mol) 混合単分子膜の π -A 等温曲線を異なる圧縮速度で測定した。

等温曲線の測定は第一章の方法に従った。圧縮速度は 10、5、および $1 \text{ \AA}^2/\text{molecule}/\text{min}$ とした。圧縮速度変化時の π -A 等温曲線の崩壊現象を調べて膜の相分離を検証した。

LB 法を用いた脂質膜の調製

反応生成物 POG 分子の POPC 単分子膜への影響を明らかにするために、POPC と POG から成る混合単分子膜の相溶性を研究した。単分子膜のアシル基の疎水性構造を調べるため、POPC 単分子膜と POPC/POG 9:1 (mol/mol) 混合単分子膜から Langmuir-Blodgett (LB) 法により LB 膜を調製した。LB 法は Langmuir と Blodgett によって開発された方法で、サブフェーズ上に作製した単分子膜を基板に写し取る手法である。脂質単分子膜の親水面に吸着し疎水面を表にする支持体としてマイカ（雲母）を用いた。マイカは応研商事株式会社（東京）から購入した。LB 膜は新しく劈開したマイカ表面上に作製した。²³ 良質な測定サンプル調製のため、LB 膜調製時には毎回マイカを劈開して清浄な面を膜転写に使用する。基板上への脂質単分子膜の転写を確認するため、蛍光プローブ DiI を上述した FM 法のように脂質溶液に最終濃度 0.2 mol % で添加した。²⁴ あらかじめサブフェーズ中にマイカを沈めた後、脂質溶液をサブフェーズ上に展開して溶媒を蒸発させるため 20 分間静置した。目的の表面圧まで単分子膜を圧縮した後、0.1 mm/min の一定速度で単分子膜を転写させながらマイカ薄板を垂直に引き上げた。²³ 膜の堆積回数は一つの LB 膜につき一回である。室温で自由水を除去するため、すべての LB 膜は乾燥シリカゲルを用いてデシケーター中で一晩保存した。

AFM による脂質 LB 膜の観察

AFM を用いて脂質の LB 膜を観察した。マイカ表面は親水性なので、堆積回数一回の LB 膜では脂質単分子膜の疎水面を観察できる。市販の装置 (NV2500、オリンパス、東京) のタッピングモードで AFM 測定を行った。AFM 測定にはばね定数 ~ 42 mN/m (NV2500) のシリコンカンチレバーを使用した。

2.2 結果

脂質単分子膜の π -A 等温曲線比較

脂質単分子膜の等温曲線を Figure 6 に示す。POG 単分子膜 (左の等温曲線) は POPC 単分子膜 (Figure 6 の中心の等温曲線、Figure 3b から引用) よりも分子専有面積が小さい。PLC 加水分解反応による POPC 単分子膜の表面圧減少 (Figure 3a) は、POPC 分子が POG 分子に加水分解されたことを示す。また、単分子膜からサブフェーズへホスホコリンが移動する現象も示唆している。しかしながら、POPC+PLC 単分子膜 (Figure 6 の右の等温曲線) は、POPC 単分子膜より分子専有面積が大きい。この反応終了後の表面圧増加 (Figure 3a) は、反応生成物 POG の単分子膜上への PLC 侵入による膜の稠密化と考えられる。

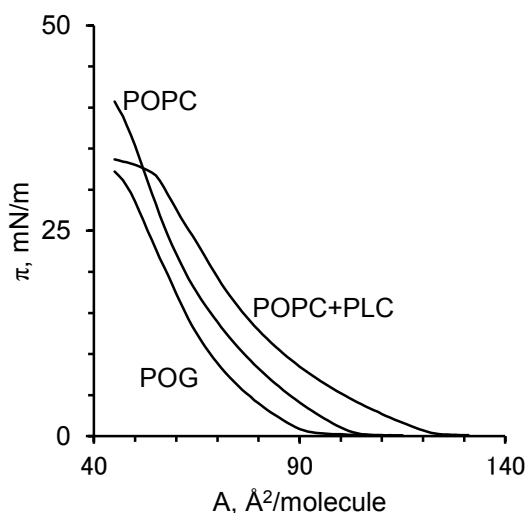


Figure 6. π -A isotherms in lipid monolayers. Right: Isotherm after PLC reaction at surface pressure of 10 mN/m for 1 h in POPC monolayer; Center: POPC isotherm reproduced from Figure 3b; Left: POG isotherm. Compression velocity of isotherms, $0.33 \text{ \AA}^2/\text{molecule}/\text{sec}$.

POPC/POG 混合単分子膜の π -A 等温曲線の圧縮速度による影響

POPC/POG 混合膜の崩壊性についての結果を Figure 7 に示す。圧縮速度 10 と 5 $\text{\AA}^2/\text{molecule}/\text{min}$ (測定時間: 約 13 分および 25 分) の等温曲線は滑らかな曲線だった。しかしながら、圧縮速度 1 $\text{\AA}^2/\text{molecule}/\text{min}$ (測定時間: 約 2 時間) では等温曲線中に ~3-4 mN/m の表面圧でプラトー領域が現れた。分子専有面積が減少しても表面圧がほとんど変化しないことから、POPC/POG 9:1 (mol/mol) 混合単分子膜の崩壊による脂質二分子膜への相分離が起きたことが予想された。圧縮速度 1 $\text{\AA}^2/\text{molecule}/\text{min}$ で測定時間約 2 時間の圧縮操作において相分離が確認されたことから、相分離はすぐに起きるのではなく時間単位のスケールで進むことが予想された。また、相分離による詳細な膜構造は等温曲線からは明らかにできなかった。その理由として、膜圧縮により POPC 単分子膜の一部がサブフェーズ中へのリポソーム化による溶解が予想された。

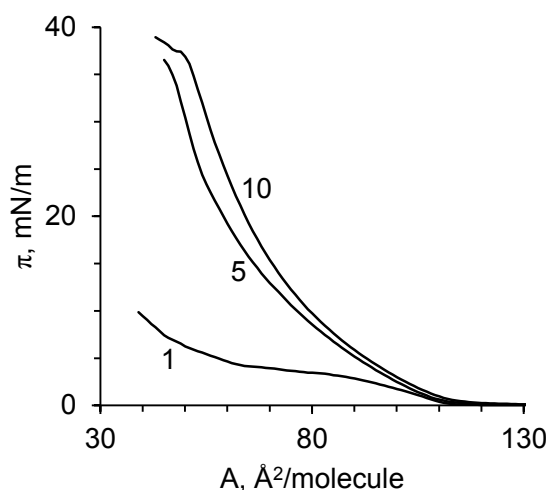


Figure 7. π -A isotherms in mixed monolayers of POPC/POG 9/1. Compression velocities of isotherms: 10, 5, and 1 $\text{\AA}^2/\text{molecule}/\text{min}$ (right, center, and left, respectively).

AFM による脂質 LB 膜の観察

AFM 画像 (Figure 8a) は、表面圧 10 mN/m で調製した POPC の LB 膜表面は平滑で均一であることを示した。表面圧 5、15、および 20 mN/m の単分子膜から調製した LB 膜でも同様な構造を確認した。また、POPC/POG 9:1 (mol/mol) の混合単分子膜から調製した LB 膜の AFM 画像 (Figure 8b) は POPC 膜表面上に楕円構造を示し、POG 添加により相分離が現れた。ただし、LB 膜は膜表面圧 18.5 mN/m で調製した。同様の構造を POPC/POG 7:3 (mol/mol) の LB 膜でも観察した。POPC の LB 膜では観察されなかったことから、楕円構造には POG 分子が高い割合で含まれていると予想される。この楕円構造を“POG が豊富なナノドメイン”と名付ける。ひとつのナノドメインは周囲の領域よりも 1–1.5 nm 高い。これはナノドメインが単分子膜から相分離し疎水性側に突き出していることを示唆している。Li と Salditt の報告によると POPC 二分子膜の幅は約 3.6 nm であり、²⁵ それゆえ、1.8 nm が POPC 単分子膜の厚みに対応するものと推測される。Smaby と Brockman は疎水性の高い脂質を含む単分子膜の膜圧縮による構造変化を報告した。²⁶ 彼らは DAG より疎水性が高いコレステロールエステルを含んだ脂質単分子膜の π -A 等温曲線を測定した。等温曲線の測定結果に基づき、気液界面上のコレステロールエステル分子が膜の圧縮により脂質単分子膜の疎水基側へ移動し二層構造を形成するモデルを提案した。これらの過去の報告に基づくと、POG が豊富なナノドメインは約 1 層の膜厚で単分子膜から突き出し、親水性側を上にして脂質二分子膜に似た構造を形成することが予想された。

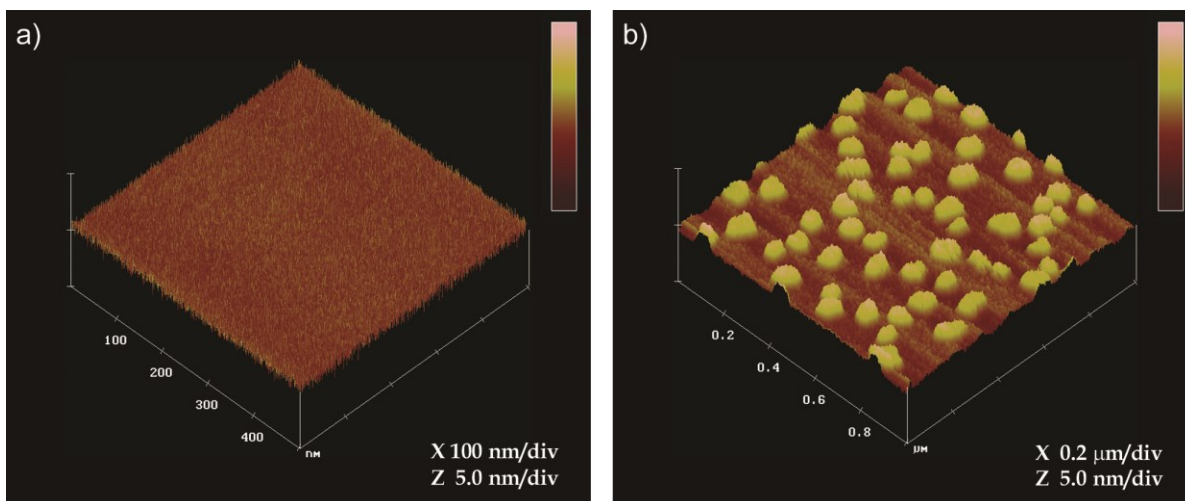


Figure 8. AFM images of hydrophobic surface on (a) POPC LB film at prepared surface pressure of 10 mN/m (areas of $500 \times 500 \text{ nm}^2$) and (b) POPC/POG 9:1 mixed LB film at 18.5 mN/m ($1 \times 1 \text{ } \mu\text{m}^2$). Height scales at right. Both films were visualized with 0.2 mol % DiI.

2.3 考察

ここで POG に富むナノドメインの特徴を考えてみる。POG に富むナノドメインの AFM 画像 (Figure 8b) はナノドメインの平均内径が~75 nmであることを示した。この内径の、すべてのナノドメインの総面積は脂質の単位表面積の~25%を占め、この値は添加した POG 分子より 2.5 倍多かった。PC と DAG の双方が複合体を形成することはよく知られている。¹ Heimburg らは示差走査熱量測定、³¹P 核磁気共鳴、および X 線回折法に基づいて PC と DAG の二成分の相図を提案した。²⁷ 彼らは~1:1 と 1:2 のモル比の PC/DAG 複合体形成を指摘した; これらの複合体をそれぞれ C1 と C2 と明記した。Jimenez-Monreal らは同様の実験方法を用いて POPC/POG の系で類似した相図を提案した。²⁸ 彼らは複合体 C1 の POPC/POG モル比が 60/40 で複合体 C2 は 30/70 だと報告した。これらの過去の報告から考察すると、本研究で観察した POG に富むナノドメインは複合体 C1 と類似していると考えられた。

第三章 脂質ナノドメインにおける加水分解反応と生成物 POG のドメイン形成序論

第一章で、POPC 単分子膜が約 10%加水分解された後にその加水分解反応が急激に進むことを確認した。さらに、第二章では、POPC/POG 9:1 (mol/mol) 混合単分子膜の LB 膜の AFM 画像から POG に富むナノドメインの相分離が起きることを確認した。これらの結果からタイムラグ後の PLC 加水分解反応は POG の相分離により加速されたと考えられる。その時、PLC は POG 膜上に侵入し残ることが予想された。これらの結果に基づいて、第三章では加水分解反応の至適表面圧で PLC を POPC 単分子膜と反応させ、その LS 膜を作製し反応が起きる親水性表面を AFM により解析した。LS 膜の親水性表面の断面解析および LS 膜の経時変化による構造変化を検証した。さらに、加水分解した単分子膜から調製した LS 膜、および吸着する酵素を除去した LS 膜の表面構造を AFM により比較検証し酵素の反応場を探る。

3.1 実験方法

LS法を用いたPOPC膜の調製

POPC単分子膜の親水面構造を解析するため、Langmuir-Schaefer (LS)法を用いて単分子膜からPOPCのLS膜を調製した。LS法はLangmuirとSchaeferにより開発された方法で、膜の固定用基板を水平に付着させて調製する。本研究では、LS法を膜の親水面構造を検証するために用いた。脂質単分子膜の疎水面に吸着し親水面を表にする支持体としてオクタデシルトリクロロシラン (OTS)でアルキル化したマイクロカバーガラス (OTSガラス)を用いた。²⁹OTSはSigma-Aldrichから購入した。基板上への単分子膜の転写を確認するために、蛍光プローブDiIを上述したFM法のように脂質溶液に最終濃度0.5 mol %で添加した。²⁴20分間溶媒を蒸発させた後、目的の表面圧まで単分子膜を圧縮した。水平付着法により単分子膜をOTSのガラス表面上に転写した。LS膜転写を実行するため、アスピレーターMDA-050 (アルバック機工) に接続されたチューブ吸引口にOTSガラスを吸着させてOTSガラスを操作した。OTSガラスを単分子膜の上方に保持して単分子膜に触れるまで慎重に下げてそっと単分子膜の疎水性表面上に置いた。数秒後、単分子膜まで含んでガラスを押してLS膜を作製した。LS膜を回収した後、緩衝液の塩を除去するために二度蒸留水で洗浄した。室温で自由水を除去するためすべてのLS膜は乾燥シリカゲルを用いてデシケーター中で一晩保存した。

POPCのLS膜表面への断面形成

LS膜の性質を検証するため、加水分解されたPOPCのLS膜表面の脂質断面を分析した。PLC反応至適表面圧の初期表面圧10 mN/mにおいて、PLC注入前、注入5分後、

および 25 分後で LS 膜を調製した。ガラス固定のためあらかじめ蒸留水で OTS ガラスを 1 mm の銅板の表面に貼り付けその集合体を液体窒素中へ沈めた。液体窒素下で工作用ナイフエッジの背を用いて LS 膜を静かに擦り脂質膜の断面解析用の線状の裂け目（ギャップ構造）を作製した。FM 観察により蛍光プローブを含む LS 膜の表面のギャップ構造は数日間では移動したり変化したりしないことを確かめた。この結果は、LS 膜上の脂質は OTS ガラス上で単分子膜を写し取った時の状態を維持し脂質の横方向への拡散がほとんど起こらなかったことを示唆する。この結果から LS 膜の AFM 画像が高い再現性を持つことが確認できた。上記のように全ての LS 膜を一晩保存した。

加水分解された POPC の LS 膜調製

PLC 反応至適表面圧の初期表面圧 10 mN/m において POPC 単分子膜を加水分解した。PLC の反応条件は第一章の方法に従った。PLC 溶液注入前、反応中間の注入 15 分後、および反応が終了する 60 分後において単分子膜上に OTS ガラスを置いた。反応 60 分後、すべての OTS ガラスを回収して加水分解された POPC 単分子膜の LS 膜を調製した。PLC を除去するため、PLC 注入 15 分後および 60 分後において調製した LS 膜の一枚ずつを食塩水、次いで二度蒸留水で洗浄した。その他の LS 膜は上記のように二度蒸留水で洗浄した。すべての LS 膜は上記のように一晩保存した。

AFM による POPC の LS 膜の観察

POPC の LS 膜を AFM で観察した。OTS ガラス表面は疎水性なので LS 膜では脂質単

分子膜の親水面を観察できる。市販の装置 (NanoScope III、Digital Instruments、東京、および NV2500、オリンパス、東京) のタッピングモードで AFM 測定を行った。AFM 測定では、ばね定数 ~ 20 (NanoScope III) および ~ 42 mN/m (NV2500) のシリコンカンチレバーを使用した。

3.2 結果

POPC の LS 膜の断面解析

AFM 画像の結果 (Figure 9a) が示すように、ギャップ構造の深さは PLC が無い条件で 6.9 nm および 10.2 nm であった。これらのスケールは POPC 二分子膜の半分の厚さ (1.8 nm)²⁵ よりも大きく、POPC 単分子膜の親水性表面上に結合水の層の存在を示唆する。LS 膜表面は階段に似た構造として観察されたので、その結合水を“階段状の結合水”と名付けた。PLC 注入前と注入 5 分後の結果 (Figure 9a と b) が示すように LS 膜の厚さは 10.2 nm から 20.9 nm まで 10.7 nm 増加した。第一章の PLC 反応に基づいて、Figure 9a の示す膜はちょうど反応開始前の単分子膜の状態を反映していると考えられる。また Figure 9b の示す結果は PLC が POPC 膜へ侵入したことによりその膜厚が増加したことを示唆する。Hough らによると、PLC 結晶構造の全体の寸法は $6 \times 4 \times 3 \text{ nm}^3$ だった。³⁰ それゆえ、10.7 nm の厚さの増加は POPC、PLC、および結合水の三成分による反応系が膜表面に形成されたことを示す。反応 25 分後、Figure 9b と c に示すように、膜厚は 20.9 nm から 17.4 nm へ厚さが 3.5 nm 減少した。第一章の PLC 反応に基づいて、この膜厚の減少は PLC が侵入した POPC 単分子膜の形成を反映していると考えられる。厚さ 3.5 nm の減少は結合水を伴うホスホコリンの膜からの脱離に伴うと予想された。

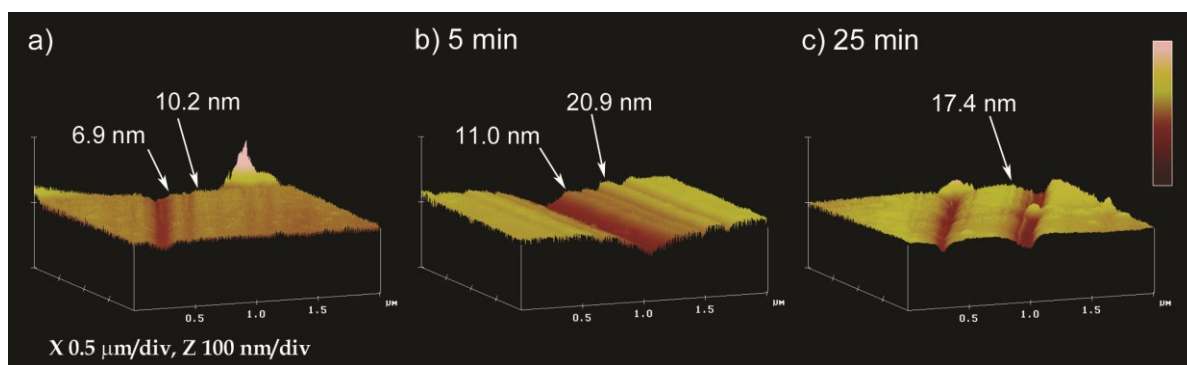


Figure 9. Cross-sectional analysis of AFM images on LS films prepared from POPC monolayers hydrolyzed by PLC at 10 mN/m: (a) before PLC injection (PLC not reacting), (b) 5 min after PLC injection, and (c) after 25 min. Values with arrows, depth from gap bottom.

加水分解された POPC の LS 膜の AFM 観察による表面解析

PLC 加水分解反応の進行前では膜表面上に多くの突起を観測した (Figure 10a)。突起一つは平均内径 40 nm で高さ 5 nm だった。PLC 注入から 15 分後において同様の突起を LS 膜表面上に観察した (Figure 10b)。PLC 反応前の LS 膜の画像 (Figure 10a) と反応後の LS 膜の画像 (Figure 10b) 双方の結果から表面構造の違いは区別できなかった。

ここで、AFM 画像 (Figure 10b) は PLC 分子が LS 膜上に侵入した画像である。PLC 除去時の LS 膜構造を調べるため、Figure 10b で示す LS 膜の調製と同時に膜表面を生理食塩水と二度蒸留水で洗浄した LS 膜も調製した。Figure 10c に示すように、PLC 除去時の LS 膜表面には複数の突起と多くのポケットが共存していた。ポケットの平均内径は 40 nm で高さは 7 nm だった。ポケットの個々の面積は突起一つの面積とおおよそ同じ大きさである (それぞれ Figure 10c と a)。その上、前述したように、POPC 膜から突出した POG が豊富なナノドメインもまた同じサイズの構造であった (Figure 8b)。つまり、ポケットは POG 分子の集合体で、POPC の突起に PLC が反応したことが予想される。AFM 画像 (Figure 10d) は反応終了後に調製した LS 膜表面から侵入した PLC 分子を除去した POG の滑面である。反応終了後、POPC 分子がほとんど加水分解されて POG 分子に変化したことを示す。以上の結果から、表面圧 10 mN/m の L1/L2 相で L2 相の POPC 分子はパッキングにより表面が結合水で覆われた突起構造のナノドメインを形成したと予想した。

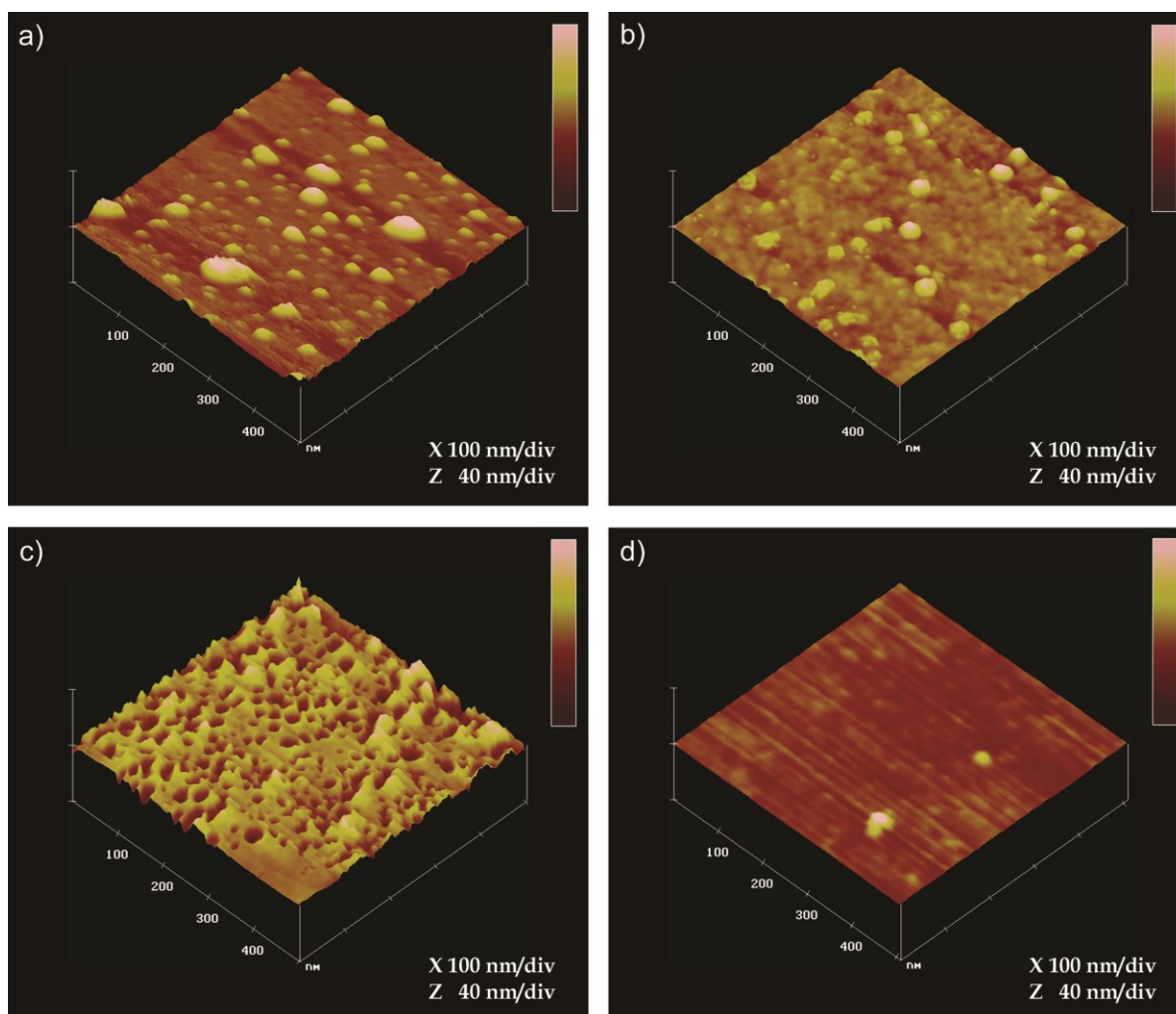


Figure 10. AFM images of LS films prepared from POPC monolayers hydrolyzed by PLC at 10 mN/m: (a) before PLC injection (PLC not reacting), (b and c) 15 min after PLC injection, and (d) after 60 min. Films a and b were washed with redistilled water. Films c and d were washed sequentially with saline solution and redistilled water to remove PLC. Mean diameters and heights of protrusions were 40 and 5 nm, respectively, and analogous dimensions of pockets were 40 and 7 nm, respectively.

3.3 考察

この章では、AFM を用いた断面解析により POPC の LS 膜上に階段状の結合水を観察した。その結合水の高さは PLC の侵入によって増加した。さらに、LS 膜上に結合水で覆われた突起を観察した。PLC の反応途中では POPC 突起が POG ポケットに変わった。単分子膜のパッキングにより、POPC の親水性頭部基はパッキングされて突起を形成し、アシル鎖は傾いたと考える。第二章に述べた POG の POPC 膜からの相分離の結果と同様に、PLC 反応により POG 分子が POPC 膜から相分離することが予想された。PLC が反応したナノサイズの突起は L1 膜中に現れた L2 状態のディスク状の POPC 集団であると結論した。

第四章 POPC 単分子膜の稠密化による親水性表面の構造変化 序論

第一章で、PLC による POPC 単分子膜の加水分解反応は反応速度が初期表面圧に依存し加水分解反応の開始までラグタイムがあることを確認した。また、第二章と第三章では、脂質分子の頭部基のパッキングによって形成される L2 状態の POPC ナノドメインにおいて酵素反応が選択的に進むことを示した。そこで第四章では、頭部基のパッキングに伴い PLC 加水分解反応速度が変化した理由を確かめるため、酵素が反応する親水性表面構造を詳細に調べた。異なる表面圧で POPC 単分子膜の LS 膜を調製してその親水性表面構造を AFM 観察し、酵素活性が膜表面圧に依存する理由を調べた。

4.1 実験方法

POPC の LS 膜調製

膜表面圧 1、5、10、15、17、および 20 mN/m の 6 つの異なる表面圧で POPC の LS 膜を調製した。LS 膜作成方法は第三章の実験に従った。

AFM による POPC の LS 膜の表面観察

AFM により POPC 単分子膜の LS 膜を観察した。市販の装置 (NanoScope III、Digital Instruments、東京、および NV2500、オリンパス、東京) のタッピングモードで AFM 測定を行った。AFM 測定では、ばね定数 \sim 20 (NanoScope III) および \sim 42 mN/m (NV2500) のシリコンカンチレバーを使用した。

4.2 結果

AFM による POPC の LS 膜の表面解析

ガスと液体拡張膜から成る LS 膜は膜表面圧 1 mN/m の POPC 単分子膜から調製した。その LS 膜の AFM 画像 (Figure 11a) は不均一で、G/L1 相を反映している。表面圧 5、10、および 15 mN/m で調製された L1/L2 混合相では、Figure 10a に現れた同様の突起を膜上に多数観察した (Figure 11b-d)。表面圧 10 と 15 mN/m では、多数の突起が膜表面ほとんどを覆った。表面圧 17 と 20 mN/m の L2 相では、突起がほぼ消失し膜表面が滑らかな構造になった。親水性 LS 表面は水で覆われているので、乾燥力の強い乾燥剤で付着水また結合水を除き LS 膜の構造を検証した。五酸化二リンによる短時間乾燥とシリカゲルによる長時間乾燥の双方で複数の突起および滑らかな構造はより小さくなるか消失する結果となった。複数の突起と滑らかな構造の大部分は水分子から構成されていることが示唆された。これらの観察を踏まえて POPC 膜上の親水性表面構造、物性とその膜モデルを考察した。第三章に示したように、これらの膜中で脂質の横方向への拡散がほとんど起きず、膜の表面は階段状の結合水で覆われていることが示唆された。

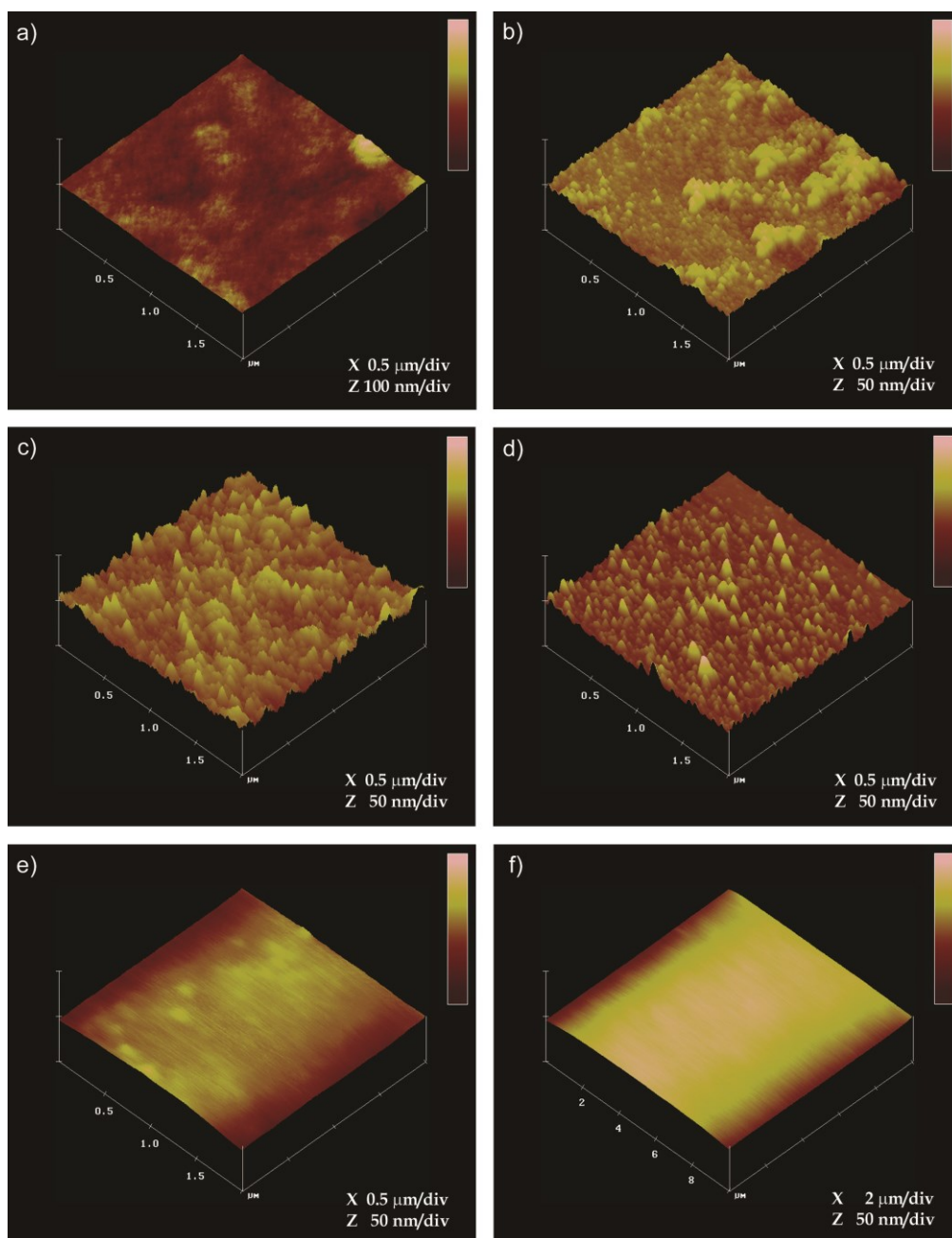


Figure 11. AFM images on POPC LS films. Prepared surface pressures (phase) and areas of AFM observations were, respectively: (a) 1 mN/m (G/L1 phase), $2 \times 2 \mu\text{m}^2$; (b) 5 mN/m (L1/L2 mixed phase), $2 \times 2 \mu\text{m}^2$; (c) 10 mN/m (L1/L2 mixed phase), $2 \times 2 \mu\text{m}^2$; (d) 15 mN/m (L1/L2 mixed phase), $2 \times 2 \mu\text{m}^2$; (e) 17 mN/m (L2 phase), $2 \times 2 \mu\text{m}^2$; and (f) 20 mN/m (L2 phase), $10 \times 10 \mu\text{m}^2$. Height scale shown in upper column: (a) 100 nm and (b–f) 50 nm.

4.3 考察

ここで POPC 膜上の親水性表面構造の特徴を考える。第三章で、LS 膜上で脂質の側方拡散がほとんど起きずその膜表面は Figure 9 に示すように階段状の結合水で覆われていた。L1/L2 相の POPC 混合膜で突起は表面圧上昇と共に数が増加した。膜表面圧 17 と 20 mN/m の L2 相では、突起が消失して層構造を形成し PLC 反応がほとんど進行しない。つまり、POPC 単分子膜のパッキングによる表面の結合水の増加により膜表面構造は Figure 11a から f へ変化した。それゆえ、突起は L2 相の性質を有しており結合水で覆われた POPC 分子集合体により形成される構造だと結論付け、“水結合ナノドメイン”と呼ぶことにする。

この章では、L1 膜と L2 膜の双方の間で L1/L2 混合状態にある POPC 単分子膜の特徴として POPC 分子集合体が水結合ナノドメインを形成することを明らかにした。その L2 状態のナノドメインの面積は 2000 から 8000 nm² のサイズで、平均値 4400 nm² であり、膜表面圧 10 mN/m で 3000 から 12000 の POPC 分子に対応する。頭部基とアシル鎖の双方のパッキングに加えて、頭部基のパッキングによって膜表面に発生する結合水も脂質膜の物理的特性を決める主要因の一つと考える。

POPC 単分子膜の表面に結合する水のモデルは以下の実験でも確認された。LS 膜の調製において、引き上げられた OTS ガラスの表面に 10 mg/2.5 cm² を超すサブフェーズの水が付着する。この付着する水の量は表面圧の上昇とともに増加する。この結果は POPC 単分子膜の親水面に水の層が形成されることを支持する。

考察

POPC 単分子膜における PLC 加水分解反応の表面圧依存性

POPC 単分子膜における第一章から第四章までの結果は PLC による加水分解反応が L1/L2 混合相で急速に進行したが L2 相ではほとんど進行しないことを実証した。L1/L2 混合相に現れた複数の突起は PLC の反応場であり結合水で覆われた L2 状態のディスク様 POPC の集団だった。その POPC の集団は親水性頭部基がパッキングされアシル鎖が傾き全体の L1 膜相中に分散すると推論した。考察では、POPC 単分子膜における PLC 加水分解反応のモデルを提案し反応の表面圧依存性を議論する。

POPC 単分子膜の膜構造と PLC の反応機構

PLC による POPC 単分子膜の加水分解反応はタイムラグを境に最初の反応と二番目の反応の二つの反応で構成されていた。最初の反応において、酵素の単分子膜中への侵入後表面圧が減少すると共に反応生成物のホスホコリンの量は増加した。PLC 加水分解反応が進行する L1/L2 相は L1 膜と L2 膜の二つの膜の性質を示した。ここで、酵素反応、POG と POPC の相溶性および脂質ナノドメインの結果に基づいて、L1/L2 相における PLC 加水分解反応の概略モデルを Figure 12a に示す。PLC は L1 相と L2 相の境界付近で膜に侵入し POPC を加水分解する。表面圧 5~17 mN/m の単分子膜の加水分解反応において、最初の反応は PLC 添加後に現れた。Figure 3 に示すように、表面圧が上昇するのに伴って 15~17 mN/m の単分子膜において反応のラグタイムが増加して最初の反応の速度は遅くなった。最初の反応は約 10 mol % の POG が生成されるまで進んだ。二番目の反応は約 10 mol % の POG 生成後急激に進行し反応は擬一次反応とし

て加水分解反応の終了時まで継続した。

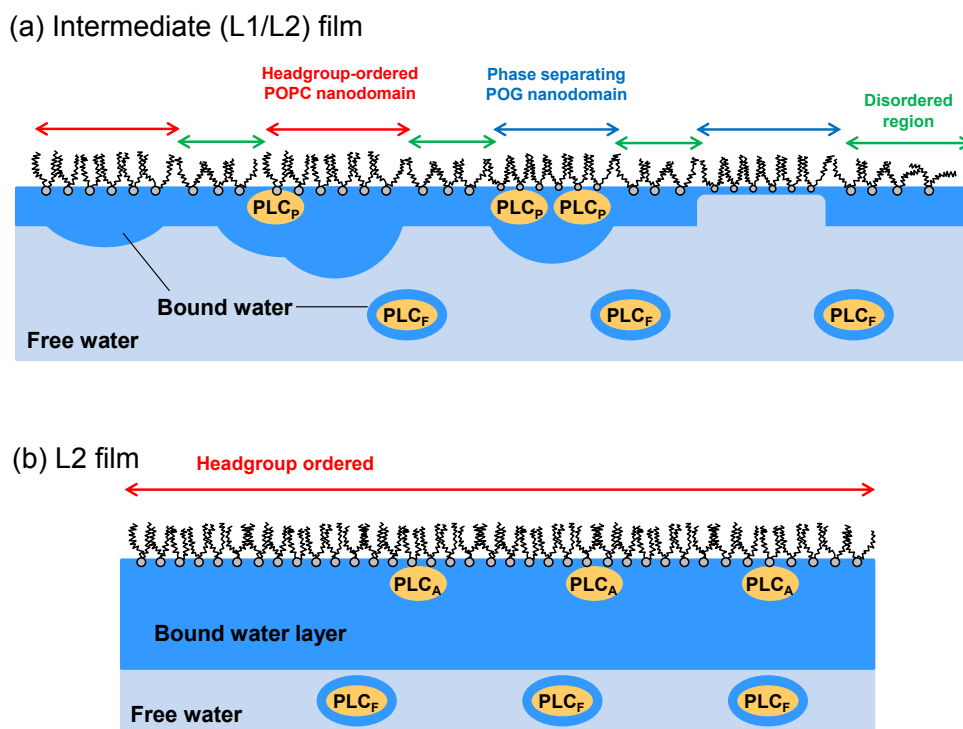


Figure 12. Schematic models of PLC reactions on the hydrophilic surface of POPC monolayers of intermediate film (a) and L2 film (b). The intermediate film (a) is a mixture of both L1 and L2 states. The L1 state is a disordered liquid-expanded state, and the L2 state is a liquid-condensed state in which headgroups are ordered. “PLC_P” indicates PLC penetrating the membrane, and “PLC_F” indicates free PLC. In the intermediate film, the L2 state nanodomains are covered with bound water, are hydrolyzed by PLC, and form POG nanodomains separated from the monolayer. In L2 films (b), the transition surface pressure from intermediate film to L2 film in the monolayer is ~ 17 mN/m. The bound-water layer is formed on the hydrophilic surface, and the PLC reaction proceeds only minimally. “PLC_A” indicates PLC adhering to the membrane.

Verger と共同研究者によればこれらの反応は三つのプロセスにより示される。脂質膜上に PLC が侵入するプロセス (第一章の式 1)、PLC_p と POPC の複合体形成 (式 2)、および POPC-PLC_p 複合体の加水分解 (式 3) である。^{2,3} 本研究で膜に侵入するプロセスは PLC 添加後の表面圧一定の状態として観測された。その後圧力が急激に減少し反応生成物の形成が開始され式 2 と 3 の双方の反応プロセスが進行する。酵素が膜に侵入するプロセス (式 1) は複合体形成 (式 2) と複合体の加水分解 (式 3) より活性化エネルギーが高いため、酵素が膜に侵入すると同時に複合体形成と複合体の加水分解は終了する。複合体の加水分解で生成する POG の増加により逆反応が現れて反応は平衡点で停止する。Verger の提案した反応プロセスに従うと最初の反応がこの過程に当たる。^{2,3} 生成物量が平衡状態に到達すると見かけ上反応は途中で終了する。Figure 1a に示すように POPC 単分子膜の加水分解率の結果から反応が途中で終了する時の分解生成物 POG の濃度は約 10 mol % と予想された。ラグタイム前の反応は POPC:POG 9:1 (mol/mol) の混合膜を形成して途中で終了する。その後混合膜から POG が相分離することで混合膜中の POG 濃度は減少し加水分解反応が加速される。この相分離と加水分解過程が連続的に進むことで反応は加速されて POPC はほとんど 100%加水分解される。後半の相分離の過程が二番目の反応として観測される。つまり、反応は相分離にも依存していた。その相分離は以下のように n 次反応で示される、四番目の過程として考えられた ($n = \sim 3000$)。



最後に、単分子膜中で加水分解が表面圧に依存する理由として単分子膜への酵素の侵入過程、複合体の加水分解過程、およびそれに続いて起きる再編成過程は、単分子膜の流動性により制御されると結論づけた。この流動性は単分子膜の相の数と相の物性に依存するので反応は相分離にも依存する。

脂質単分子膜におけるナノドメインとナノサイズの膜相分離 酵素反応場として脂質凝縮膜のナノドメイン

第三章で説明したように、PLC が POPC の LS 膜上でナノサイズの突起領域に反応することを確認し、突起は L1 膜中に存在する L2 状態の円盤状の POPC クラスタであることを示した。突起の直径は約 40 nm で結合水で覆われた高さは 5 nm だった。同じサイズのポケットをまた POPC 単分子膜の加水分解後に調製した LS 膜上に確認した。ポケットサイズは直径約 40 nm で深さが 7 nm でポケットの深さは POPC 分子のアシル鎖長 1.8 nm を超えた。²⁵ さらに、ホスホリルコリン基の長さを考慮すると突起の頂点からポケットの底までのギャップの高さは結合水の層となり 11 nm を超す。水一分子の大きさ約 0.3 nm を考慮すると水分子約 35 層に対応した。そのギャップの高さは断面解析から得られた 10 nm のギャップの高さとよく一致した。突起は L1/L2 相における表面圧上昇と共にその突起数が増加した。加水分解反応の至適表面圧 10 mN/m で調製した LS 膜中で突起を最も明確に観察した (Figure 10a と 11c)。それゆえ、頭部基のパッキングとアシル鎖の傾きの双方により L1 膜中に L2 ドメインを形成したと結論付けた。同様の酵素反応場としての脂質ドメインの結果を Grainger らが過去に報告していた。⁴

彼らは落射蛍光顕微鏡を用いて DPPC の単分子膜と PLA₂ の反応を直接観察した。彼らは L1 相と L2 相の境界で加水分解を観察したことを報告した。L2 相における DPPC 膜は L1 膜中に巨視的サイズで結晶化されているため、結晶化単分子膜へ PLA₂ が侵入できないことに基づいて DPPC 加水分解は境界域にのみ出現したと解釈される。DPPC と POPC はアシル鎖が異なるが、L1 相と L2 相の間の熱平衡状態での単分子膜上で L2 膜の境界の横方向拡散はドメイン内部の領域と比較して高いことは共通すると予想される。POPC 単分子膜の L2 膜中のナノサイズドメインは横方向の拡散に関して DPPC 単分子膜の結晶化して成長したマイクロサイズドメインよりも大きいことが予想される。これゆえ、ナノサイズのパッキングと頭部基の横方向の動きの双方が酵素反応の進行に必要な条件と予想した。

ナノサイズ脂質膜の膜相分離

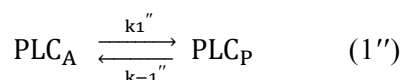
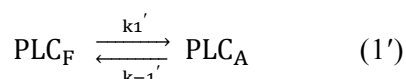
ここでは、POG に富むナノドメイン、POPC のナノドメイン、および POG ポケットを含む、三つのナノ構造をほぼ同じ大きさで生成することに関わる要因を議論する。POG の親水性頭部基のサイズが POPC のそれよりも小さかったがこれらの構造はほぼ同じ大きさだった。本研究では同じ大きさとなる現象を明らかにするような証拠を見つけることができなかったが以下のようにナノドメインの大きさを調節する要因を考察した。単分子膜のパッキングで限られたサイズのナノドメインが液晶状態の膜中に形成された。頭部基のパッキングによる安定化エネルギーと傾斜化によるアシル鎖の運動エネルギーより脂質ドメインを形成することで全自由エネルギーが最小化すると

仮定した。さらに、ドメインサイズがナノサイズである理由として脂質分子は配向した親水性頭部基と傾斜した疎水性アシル鎖との双方が共存する熱平衡状態にある単分子膜系と予想した。しかしながら、2個の飽和アシル鎖を有する他の PC の単分子膜ではより大きなサイズのドメインを形成する。例えば、転移温度 41 °C の DPPC の単分子膜はマイクロサイズのドメインの形成をする。^{4,18} それゆえ、ナノドメインのサイズは不飽和脂肪酸およびその側鎖の長さによっても支配されるだろう。POPC および POG ナノドメインの形成を脂質二分子膜に当てはめると二分子膜の $L\alpha$ 状態に対応した液晶状態で生じる現象³¹ である。生体膜において単分子膜と同様のドメイン形成が $L\alpha$ 相で起きることが予想される。このナノドメインのサイズの話は今後も研究課題として取り上げられるだろう。

パッキングによる酵素の脂質膜への侵入阻害

三番目に、17 mN/m より大きい圧力の L2 膜でなぜ PLC 反応がほとんど進行しないかに関してその原因を取り上げた。L2 膜での PLC 反応の概略モデルを Figure 12b に示す。単分子膜のパッキングにより、脂質分子の横方向の動きの減少と水結合ナノドメインの集合による水の層の形成 (Figure 11e と f) が起きて単分子膜-水の層の一体系が形成される。この系の形成により脂質膜がバリア機能を示すと推測する。それゆえ、PLC は膜に吸着するがその侵入プロセスが阻害されて PLC 反応はほとんど L2 相で進行しないのだろう。この仮説は、二つの AFM の画像 (Figure 10a と 11c) を比較することで明らかにされる。Figure 10a は表面圧 10 mN/m で調製された LS 膜を 1 時間酵素に

曝した場合の LS 膜の AFM 表面画像である。Figure 11c は表面圧 10 mN/m で調製された LS 膜の表面画像である。両画像は同じ突起状の構造を示した。すなわち、LS 膜を 1 時間酵素に曝した場合でも PLC は LS 膜に侵入できず、単分子膜研究で用いた酵素濃度では LS 膜の表面構造は影響を受けなかった。つまり、脂質分子の横移動が制限されると酵素の膜侵入過程が抑制されて引き続く反応が停止する。それゆえ、Verger の提案した膜侵入過程の反応 (1) は以下の二つの (1') と (1'') の式に分類される。



頭部基のパッキングによる L2 膜の形成は結合水の層を形成し脂質分子の横移動が抑制される。この L2 膜の形成は酵素分子の膜侵入過程 (1'') を抑制するので、加水分解反応は酵素が L2 膜に吸着した吸着過程 (1') で停止する。吸着過程 (1') は表面圧 20 mN/m の単分子膜の加水分解反応において“膜表面圧は上昇するが、酵素反応は発現しない”結果から確認される。一方、L1/L2 混合膜のナノサイズの L2 膜は L1 膜と熱平衡状態にあるので、この L2 状態の脂質分子は横移動が可能である。これは吸着酵素の膜への侵入を可能にして酵素反応が発現する。この結果は膜侵入過程(1'')の存在を示す。

酵素反応と水

界面の酵素反応において水分活性を考慮したとき、⁵⁻⁸ 水はサブフェーズと界面の間で様々な状態で存在すると予想する。L1/L2 混合相から L2 相への相転移が起きるとき、結合水の層が形成され (Figure 11e と f) 単分子膜の親水性表面上の自由水の量が減少

する。この自由水は基質である膜と酵素双方の構造変化に必要である。

表面圧 17 mN/m より大きい表面圧で加水分解反応が停止する理由として、パッキングしたリン脂質のマイクロサイズドメインへの成長が考えられる。このドメインの成長は、1) 頭部基の横方向への動きを阻害して酵素の単分子膜への侵入を妨げ、2) さらに反応に必要な自由水の減少を引き起こす。この双方の現象の発現により表面圧 17 mN/m において反応が明確に停止した。細胞膜との関係では、細胞膜の表面圧は約 35 mN/m で、³² 不浸透性の結合水の層を細胞膜に付与するのは上記で詳述した機構であると推測する。本研究の結果に基づくと、PLC 反応は安定な L2 膜上よりも細胞融合に関わる流動性を持つ L1/L2 膜上で容易に起きるだろうことが予想される。水の膜輸送や酵素反応といった生体膜現象を明らかにするため、リン脂質のパッキングによる結合水形成のさらなる研究が必要である。

総括

本研究では、親水性頭部基のナノスケールの配向の観点から POPC 単分子膜に対する PLC の加水分解反応の機構を明らかにした。これらの反応は単分子膜の表面圧に依存した。その反応は“L1/L2 相”でよく進行し“L2 相”では停止した。

L1/L2 相では POPC 単分子膜は PLC により容易に加水分解される。POG 分子は相分離したナノドメインを形成し、そのナノドメインは POPC/POG 9/1 (mol/mol) 混合単分子膜の LB 膜から突き出した。POPC の LS 膜において POPC ナノドメインは結合水で覆われて L2 相の性質を有した。PLC 反応の至適表面圧で約 75 nm の内径の POPC ナノドメインが PLC により加水分解された。加水分解された POPC ナノドメインは縮み同じサイズの POG ポケットになった。LS 膜の親水性表面の POG ポケットのサイズは LB 膜の疎水性表面の POG ナノドメインのサイズと一致した。上記の証拠は PLC が L1/L2 混合相の単分子膜において POPC ナノドメイン (L2 膜) に選択的に反応したことを示唆した。

L1/L2 混合相と対照的に L2 相では POPC 単分子膜は PLC によりほとんど加水分解されなかった。これは単分子膜のパッキングにより POPC の LS 膜の表面が結合水の層で覆われ、この単分子膜と結合水の層が一体の系が膜のバリア機能の役目を果たすことを示唆する。

頭部基のパッキングとアシル鎖の傾斜の理論に基づいて、(1) 水と結合したリン脂質ナノドメインと水の層を伴うリン脂質マクロドメインの形成、(2) 脂質相転移と相分離に基づく酵素反応の明快なモデルを提案した。本研究は、PLC 反応が水と結合す

る L2 膜の POPC ナノドメインと POG ナノドメインの相分離に依存することを実証した。これらの結果はシグナル伝達、酵素反応、脂質ラフトの形成、膜の透過性、および細胞融合といった生物学の未解決の問題の研究における重要な知見を与えるものと思われる。

謝辞

本研究に際して終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました静岡県立大学大学院 薬学研究科 生命物理化学分野 元講師 植松 正吾 博士に深甚なる謝意を表します。

本研究を進めるにあたり数々のご指導、ご鞭撻を頂きました静岡県立大学大学院 薬学研究科 生命物理化学分野 元教授 藤井 敏 先生、並びに教授 橋本 博 先生に感謝致します。

親身なるご指導を賜りました静岡県立大学大学院 薬学研究科 生命物理化学分野 准教授 石川 吉伸 先生、講師 横山 英志 先生、助教 原 幸大 先生に感謝致します。

本論文の作成にあたり懇切丁寧なご助言を下さいました静岡県立大学大学院 薬学研究科 医薬生命化学分野 教授 奥 直人 先生、創剤科学分野 教授 板井 茂 先生、生化学分野 教授 鈴木 隆 先生に感謝致します。

名古屋大学の AFM 使用を快諾して下さった国立台湾科技大学 教授 今栄 東洋子 博士に感謝致します。

静岡県立大学 看護学部の AFM 使用を快諾して下さった同学部 元教授 木村 正人 博士、元教授 岩本 義久 博士、教授 金沢 浩明 博士、および講師 濱井 妙子 先生に感謝致します。

本研究の主論文作成時、英文原稿に対してコメントして下さった静岡県立大学 科学英語プログラム 講師 フィリップ・ホーク 先生に感謝致します。

実験および論文作成にご協力頂きました静岡県立大学大学院 薬学研究科 旧薬品物理化学教室の皆様、並びに静岡県立大学大学院 薬学研究科 生命物理化学分野の皆様

に厚くお礼申し上げます。

最後に、これまで成長を温かく見守ってくださり常に心の支えとなって頂きました
母親に深く感謝致します。

参考文献

- (1) Gómez-Fernández, J. C.; Corbalán-García, S. Diacylglycerols, Multivalent Membrane Modulators. *Chem. Phys. Lipids* **2007**, *148*, 1–25.
- (2) Verger, R.; Mieras, M. C. E.; de Haas, G. H. Action of Phospholipase A at Interfaces. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 4023–4034.
- (3) Verger, R.; de Haas, G. H. Interfacial Enzyme Kinetics of Lipolysis. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1976**, *5*, 77–117.
- (4) Grainger, D. W.; Reichert, A.; Ringsdorf, H.; Salesse, C. Hydrolytic Action of Phospholipase A₂ in Monolayers in the Phase Transition Region: Direct Observation of Enzyme Domain Formation Using Fluorescence Microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1023*, 365–379.
- (5) Rao, C. S.; Damodaran, S. Is Surface Pressure a Measure of Interfacial Water Activity? Evidence from Protein Adsorption Behavior at Interfaces. *Langmuir* **2000**, *16*, 9468–9477.
- (6) Rao, C. S.; Damodaran, S. Is Interfacial Activation of Lipases in Lipid Monolayers Related to Thermodynamic Activity of Interfacial Water? *Langmuir* **2002**, *18*, 6294–6306.
- (7) Rao, C. S.; Damodaran, S. Surface Pressure Dependence of Phospholipase A₂ Activity in Lipid Monolayers Is Linked to Interfacial Water Activity. *Colloids Surf., B* **2004**, *34*, 197–204.

- (8) Rao, C. S.; Damodaran, S. Activation of Sphingomyelinase in Lipid Monolayer Is Related to Interfacial Water Activity. Evidence from Two Disparate Systems. *Colloids Surf., B* **2005**, *45*, 49–55.
- (9) Worthman, L.-A. D.; Nag, K.; Davis, P. J.; Keough, K. M. W. Cholesterol in Condensed and Fluid Phosphatidylcholine Monolayers Studied by Epifluorescence Microscopy. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 2569–2580.
- (10) Gidalevitz, D.; Ishitsuka, Y.; Muresan, A. S.; Konovalov, O.; Waring, A. J.; Lehrer, R. I.; Lee, K. Y. C. Interaction of Antimicrobial Peptide Protegrin with Biomembranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 6302–6307.
- (11) Tsujita, T.; Okuda, H. Effect of Diolein on Hydrolysis of Phosphatidylcholine by Phospholipase C from *Clostridium perfringens*. *J. Biochem.* **1992**, *112*, 224–228.
- (12) Kaganer, V. M.; Möhwald, H.; Dutta, P. Structure and Phase Transitions in Langmuir Monolayers. *Rev. Mod. Phys.* **1999**, *71*, 779–819.
- (13) Uematsu, S.; Unno, S.; Niikura, K.; Sawaumi, T.; Akahori, Y. Structure and Function of Bile. I. Relation between the Structure of Artificial Bile and Activity of Pancreatic Lipase. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 3327–3336.

- (14) Cubero Robles, E.; Van Den Berg, D. Synthesis of Lecithins by Acylation of *O*-(*sn*-glycero-3-phosphoryl) choline with Fatty Acid Anhydrides. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *187*, 520–526.
- (15) Keller, P. M.; Person, S.; Snipes, W. A Fluorescence Enhancement Assay of Cell Fusion. *J. Cell Sci.* **1977**, *28*, 167–177.
- (16) Verger, R.; Rietsch, J.; van Dam-Mieras, M. C. E.; de Haas, G. H. Comparative Studies of Lipase and Phospholipase A₂ Acting on Substrate Monolayers. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 3128–3133.
- (17) Nielsen, L. K.; Bjørnholm, T.; Mouritsen, O. G. Thermodynamic and Real-Space Structural Evidence of a 2D Critical Point in Phospholipid Monolayers. *Langmuir* **2007**, *23*, 11684–11692.
- (18) McConnell, H. M.; Tamm, L. K.; Weis, R. M. Periodic Structures in Lipid Monolayer Phase Transitions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, *81*, 3249–3253.
- (19) Grainger, D. W.; Reichert, A.; Ringsdorf, H.; Salesse, C. An Enzyme caught in Action: Direct Imaging of Hydrolytic Function and Domain Formation of Phospholipase A₂ in Phosphatidylcholine Monolayers. *FEBS Lett.* **1989**, *252*, 73–82.

- (20) Kulovesi, P.; Telenius, J.; Koivuniemi, A.; Brezesinski, G.; Rantamäki, A.; Viitala, T.; Puukilainen, E.; Ritala, M.; Wiedmer, S. K.; Vattulainen, I.; Holopainen, J. M. Molecular Organization of the Tear Fluid Lipid Layer. *Biophys. J.* **2010**, *99*, 2559–2567.
- (21) Huynh, L.; Perrot, N.; Beswick, V.; Rosilio, V.; Curmi, P. A.; Sanson, A.; Jamin, N. Structural Properties of POPC Monolayers under Lateral Compression: Computer Simulations Analysis. *Langmuir* **2014**, *30*, 564–573.
- (22) Samuelsson, B.; Samuelsson, K. Separation and Identification of Ceramides Derived from Human Plasma Sphingomyelins. *J. Lipid Res.* **1969**, *10*, 47–55.
- (23) Diociaiuti, M.; Ruspantini, I.; Giordani, C.; Bordi, F.; Chistolini, P. Distribution of GD3 in DPPC Monolayers: A Thermodynamic and Atomic Force Microscopy Combined Study. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 321–328.
- (24) Hollars, C. W.; Dunn, R. C. Submicron Structure in $L\text{-}\alpha$ -Dipalmitoylphosphatidylcholine Monolayers and Bilayers Probed with Confocal, Atomic Force, and Near-Field Microscopy. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 342–353.
- (25) Li, C.; Salditt, T. Structure of Magainin and Alamethicin in Model Membranes Studied by X-Ray Reflectivity. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 3285–3300.

- (26) Smaby, J. M.; Brockman, H. L. Novel Surface Phase Containing Cholesteryl Esters. 1. Structural Characteristics Determined from Surface Pressure–Area Measurements. *Biochemistry* **1981**, *20*, 718–723.
- (27) Heimburg, T.; Würz, U.; Marsh, D. Binary Phase Diagram of Hydrated Dimyristoylglycerol-Dimyristoylphosphatidylcholine Mixtures. *Biophys. J.* **1992**, *63*, 1369–1378.
- (28) Jiménez-Monreal, A. M.; Villalaín, J.; Aranda, F. J.; Gómez-Fernández, J. C. The Phase Behavior of Aqueous Dispersions of Unsaturated Mixtures of Diacylglycerols and Phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1373*, 209–219.
- (29) Sagiv, J. Organized Monolayers by Adsorption. 1. Formation and Structure of Oleophobic Mixed Monolayers on Solid Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 92–98.
- (30) Hough, E.; Hansen, L. K.; Birknes, B.; Jynge, K.; Hansen, S.; Hordvik, A.; Little, C.; Dodson, E.; Derewenda, Z. High-Resolution (1.5 Å) Crystal Structure of Phospholipase C from *Bacillus cereus*. *Nature* **1989**, *338*, 357–360.
- (31) Feigenson, G. W. Phase Behavior of Lipid Mixtures. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 560–563.
- (32) Demel, R. A.; Geurts van Kessel, W. S. M.; Zwaal, R. F. A.; Roelofsen, B.; van Deenen, L. L. M. Relation between Various Phospholipase Actions on Human Red Cell Membranes

and the Interfacial Phospholipid Pressure in Monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *406*,
97–107.