

鎖長の異なるアルカン添加による脂質膜の構造変化と物性変化 Structural Changes and Mechanical Changes in Lipid Bilayers Containing *n*-Alkanes with Different Length

臼田初穂、菱田真史*

*筑波大学数理物質, 〒305-8571 つくば市天王台 1-1-1

Hatsuho Usuda, Mafumi Hishida*

*Department of Chemistry, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, 305-8571, Japan

1 はじめに

生体膜にはコレステロールや脂肪酸といった様々な種類の有機小分子が含まれており、これらの小分子が膜の物性を左右することにより生体膜の機能が保たれている。例えば、含まれる小分子によって異なる膜の流動性は、タンパク質活性や輸送過程、ホルモン活性、免疫応答を左右していることが示唆されている[1]。生体膜は二重膜構造であるため、膜の流動性だけでなく外膜と内膜のカップリングも膜に含まれる小分子によって制御されていると考えられる。しかし、小分子が膜の流動性や外膜と内膜のカップリングに与える影響はあまり知られていない。

外膜と内膜のカップリングは、弾性シート理論によって膜の曲げ弾性係数 κ と面積圧縮率 K_A に関連づけられている[2]。後述のように中性子スピネコー(NSE)で曲げゆらぎと厚みゆらぎを観測することにより κ と K_A を独立に求めることが可能である。[3,4]。

そこで我々は、有機小分子が膜の流動性に与える影響をNSEを用いて調べた。これまでに、有機小分子として簡単な構造を持つ直鎖アルカンを合成リン脂質膜に混合し、膜の構造や相挙動、弾性に与える影響を明らかにしている[5,6]。直鎖アルカンが相挙動に与える影響は、添加したアルカンの鎖長に強く依存する。膜の流動性も膜内の分子間力と関係すると予想される。有機小分子が膜物性に与える影響を系統的に理解するために、膜の流動性に対するアルカンの添加効果の鎖長依存性を調べてきた。

NSE測定では、膜の曲げゆらぎと厚みゆらぎを解析するために異なる散乱長密度分布を持つ試料を用意した。曲げゆらぎを観測するためには、軽水素を持つ脂質膜を重水中に分散させて膜全体にコントラストを付けた。一方、厚みゆらぎ観測用の試料には、アルキル鎖部分が重水素化されたリン脂質と重水素化アルカンからなる膜を重水中に分散させて、脂質膜の親水領域のみにコントラストを付けた。

NSEにより測定される中間散乱関数の緩和速度 Γ は次式で表される[4]。

$$\frac{\Gamma}{q^3} = 0.0069 \sqrt{\frac{k_B T}{\kappa} \frac{k_B T}{\eta} + \frac{(\tau_{TF} q_0^3)^{-1}}{1 + (q - q_0)^2 \xi^2}} \quad \text{式 1}$$

右辺第一項は膜全体の波打ち運動に由来し、 η は溶媒の粘性である。曲げゆらぎ解析用の試料の場合は第一項のみを用いて解析する。第二項のローレンツ関数は膜の厚みゆらぎに由来し、 τ_{TF} は厚みゆらぎの緩和時間、 ξ は厚みゆらぎの振幅と比例関係にある。 q_0 は厚みゆらぎに由来するピークの位置である。

リン脂質 DPPC (1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) に、炭素数 8、10、12、14 の直鎖アルカンを 40 mol%ほど膜に添加してNSE測定を行った。曲げゆらぎの解析から、炭素数 10、12、14 の場合は、添加アルカンの鎖長が長いほど膜の曲げ弾性係数が小さくなることがわかった。これは膜が柔らかくなっていることを意味する。また、厚みゆらぎに由来するピークは添加アルカンの鎖長が長いほど低波数側にシフトした。これは膜の厚みが大きくなったことを意味する。

そこで本研究では、添加したアルカンの鎖長と膜の厚みの関係を調べるために、SAXS測定を行った。膜の厚みを求めれば、NSEの厚みゆらぎのデータに式1をフィッティングする際にSAXSで求めた厚みを用いることができ、フリーパラメータを減らすことができる。また、NSE結果から得られた膜の力学的パラメータと膜の厚みを用いて膜のカップリング定数の定性的な変化も求めることができ、NSEの結果の解釈が大きく進展する。

2 実験

NSEの場合と同様、リン脂質はDPPCを用いた。これに、炭素数 8、10、12、14 の直鎖アルカン (C8, C10, C12, C14) を 40 mol%となるように膜に添加した。水が全体の 90 wt%となるように調製した。直径 100 nm 前後の一枚膜小胞を測定に用いた。SAXS測定はPFのBL10C, BL6Aにて行った。カメラ長は 1.1 m とし、較正はベヘン酸銀を用いて行った。測定はすべて 54 °C で行った。

また、添加したアルカンの膜内分布を調べるために、重水素化された C8, C10, C12, C14 を一般的な

DPPC 膜に 40 mol% 添加して小角中性子散乱

(SANS) 測定を行った。試料は SAXS の場合と同様に一枚膜小胞にした。SANS 測定はアメリカの National Institute of Standards and Technology (NIST) にて行った。

3 結果および考察

炭素数 8, 10, 12, 14 の直鎖アルカンを 40 mol% 添加した DPPC 膜の散乱プロファイルは図 1 のようになった。 q は散乱長ベクトルである。0.2-0.3 \AA^{-1} の範囲に見られる落ち込み位置が高波数側であるほど膜の厚みが小さいという関係がある。図 1a を見ると、DPPC 単成分膜の落ち込み位置が最も高波数側にあり、オクタンを添加した場合もほとんど同じ位置にある。より長いアルカンを添加した場合は鎖長が長いほど膜の落ち込み位置が低波数側にシフトした。これは添加アルカンの鎖長が長いほど、膜の厚みが大きくなったことを意味する。

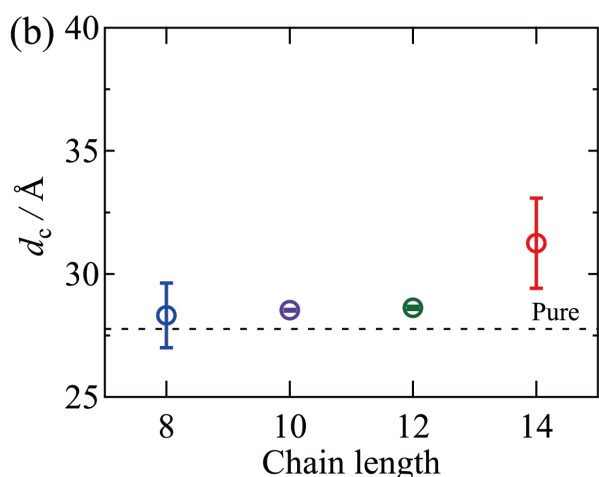
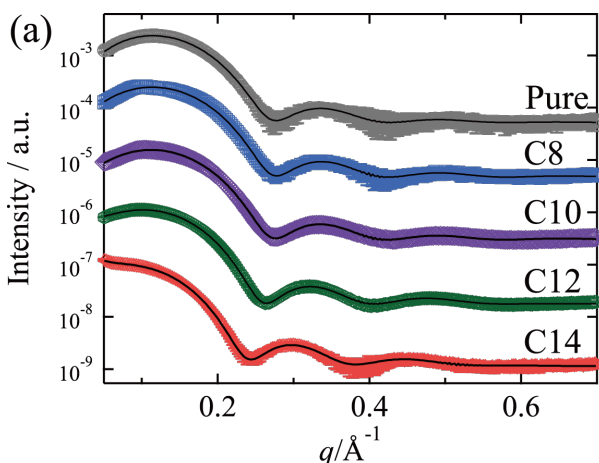


図 1 (a) DPPC/alkane = 6:4 (mol) 膜の 54°C における SAXS プロファイル。Pure: DPPC 単成分膜の SAXS プロファイル。実線は core-multi-shell model のフィッティング結果。(b) (a) でのフィッティングから求めた膜の疎水部分の厚み d_c 。破線は単成分膜の厚み。

より定量的に膜の厚みを求めるために、core-multi-shell model を用いて散乱プロファイルにフィッティングを行った。フィッティングには SasView (www.sasview.org) を用いた。core-multi-shell model は、膜を 2 つの親水領域、2 つのアルキル鎖領域、中心平面と 5 つに分けた電子密度分布を仮定したものである。フィッティングの結果、アルカン添加膜のアルキル鎖領域の厚みが図 1b のように求められた。膜の厚みは、添加アルカンの鎖長が長いほど大きくなることがわかった。この傾向は、NSE 測定により得られた厚みゆらぎのピークが、添加アルカンの鎖長が長いほど低波数側にシフトしたこととも一致する。

膜の厚み変化の傾向は、 κ の鎖長依存性とは矛盾している。なぜなら、膜の粘性が一定であれば、膜の厚みが大きくなるほど膜は曲げにくくなるはずだが、今回の結果はそれと反対だからである。このことは添加アルカンが膜の中心平面に分布して、2 つの単分子膜のカップリングを弱くしていることが原因だと考えられる。カップリングを表す定数 β は、膜を曲げるときに片面は圧縮され、もう片方は伸展されるという力学的関係から、 κ 、面積圧縮率 K_A 、膜の疎水領域の厚み d_c を用いて、次のように表される[7]。

$$\kappa = \frac{K_A}{\beta} d_c^2 \quad \text{式 2}$$

SAXS で求めた d_c を用いて式 1 を NSE の厚みゆらぎのデータにフィッティングすると、膜の振幅 ($\propto (\xi q_0)^{-1}$) は添加アルカンの鎖長が長いほど小さいことが分かった。 $(\xi q_0)^{-1}$ は K_A と下記のような関係がある[8]。

$$(\xi q_0)^{-2} = \frac{k_B T}{K_A A_0} \quad \text{式 3}$$

よって K_A は添加アルカンの鎖長が長いほど大きいことがわかる。 κ 、 K_A 、 d_c の傾向を式 2 に当てはめると、 β は添加アルカンの鎖長が長いほど大きい、つまり 2 枚の単分子膜のカップリングが弱く、滑りやすくなっていると結論される。C8 は脂質のアルキル鎖と平行に分布するのに対し、C10 より長いアルカンは膜の中央平面 (単分子膜と単分子膜の間) にも分布するからだと考えられる。これを確かめるために、重水素化されたアルカンを中心に軽水素からなる DPPC に添加して SANS 測定を行った。その結果を図 2a に示す。

図 2a を見ると、DPPC 単成分膜と C8 添加膜は 0.2 \AA 付近に山がないが、C10 添加膜と C12 添加膜は山がある。山がある場合は、膜の中央平面にもアルカンが分布していることを示唆しており、実際に図 2b に示すモデルを SANS 結果に当てはめると、C10、C12 は膜の中央平面にもアルカンが分布することがわかった。

鎖長が長いほど膜の中央平面にもアルカンが分布することから、膜のカップリングが弱くなるのは、膜の中央平面に分布するアルカンが潤滑材の役割をして2枚の単分子膜を滑りやすくするためだと考えられる。

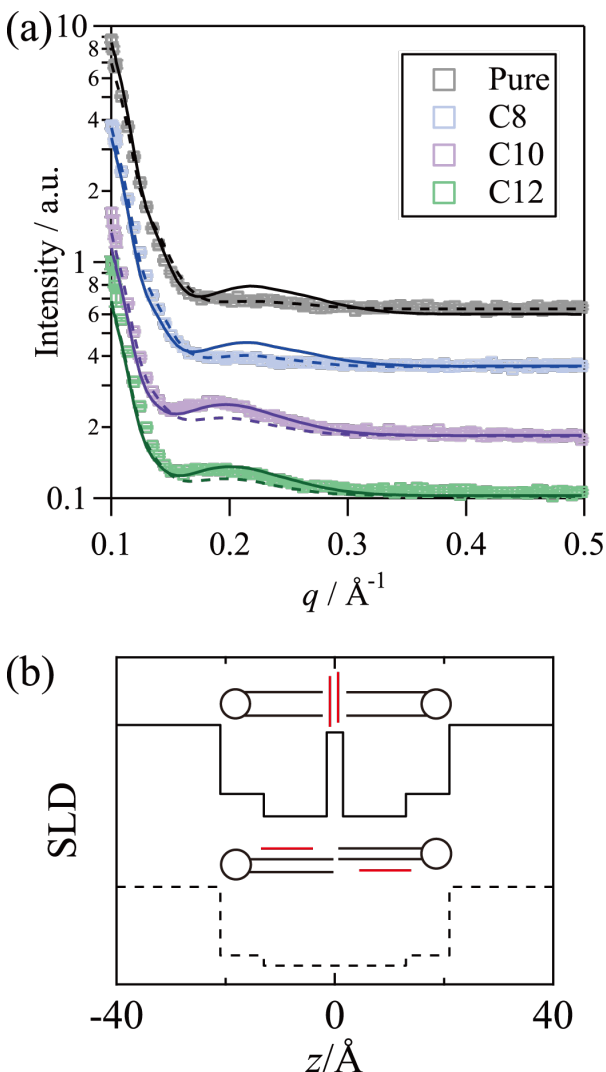


図 2 (a) DPPC/alkane = 6:4 (mol)膜の 54°C における SANS プロファイル。Pure: DPPC 単成分膜の SANS プロファイル。実線は(b)のモデルのフィッティング結果。(b) 上: 膜の中央平面にもアルカンが分布する場合の膜の散乱長密度。下: 添加アルカンがすべて脂質に平行に分布する場合の散乱長密度。

4 まとめ

DPPC 膜に炭素数 8、10、12、14 の直鎖アルカンを追加した場合、添加アルカンの鎖長が長いほど膜の厚みが大きくなることがわかった。NSE 測定で見られた厚みゆらぎのピーク位置の傾向とも一致した。SAXS で得られた膜の疎水領域の厚みの値を用いて行ったNSEの厚みゆらぎのデータのフィッティングから、添加アルカンの鎖長が長いほど、厚みゆらぎ

の振幅が小さくなり、膜の面積圧縮率は大きくなり、2枚の単分子膜のカップリングは弱くなることが分かった。SANS の結果から、鎖長の長いアルカンは膜の中心平面に分布して、2つの単分子膜のカップリングを弱くする可能性が示唆された[9]。

謝辞

本研究は、NIST の M. Nagao 博士、E. G. Kelley 博士、筑波大学齋藤一弥教授、山村泰久准教授とともに行われました。また、研究の一部は、科研費 (Grant No. 18J12652) の助成を受けて行われました。ここに感謝いたします。

参考文献

- [1] J. Szöllösi, in *Mobility and proximity in biological membranes*, CRC Press (1994). Haracska, G. Bogdanovics, Z. Torok, I. Horvath, L. Vigh, *Int. J. Hyperthermia* 29, 491 (2013).
- [2] D. Boal, in *Mechanics of the Cell*, 2nd Ed.; Cambridge University Press, 267 (2002).
- [3] A.C.Woodka, P.D.Butler, L.Porcar, B.Farago, M.Nagao, *Phys.Rev.Lett.* 109,058102(2012).
- [4] M. Nagao, E. G. Kelley, R. Ashkar, R. Bradbury, P. D. Butler, *J. Phys. Chem. Lett.* 8, 4679 (2017).
- [5] M. Hishida, A. Endo, K. Nakazawa, Y. Yamamura, K. Saito, *Chem. Phys. Lipids*, 188, 61 (2015).
- [6] M. Hishida, R. Yanagisawa, H. Usuda, Y. Yamamura, K. Saito, *J. Chem. Phys.* 144, 041103 (2016).
- [7] W. Rawicz, K. C. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham E. Evans, *Biophys. J.* 79, 328 (2000).
- [8] E. Lindahl and O. Edholm, *Biophys. J.* 79, 426 (2000).
- [9] H. Usuda, M. Hishida, E. G. Kelly, Y. Yamamura, M. Nagao, K. Saito, *Interleaflet Coupling of n-Alkane Incorporated Bilayers. Phys. Chem. Chem. Phys.* 22, 5418 (2020).

成果

1. 臼田初穂、菱田真史、Elizabeth G. Kelley、齋藤一弥、長尾道弘 「脂質膜の厚みゆらぎに対する添加アルカンの影響」 2017年3月22-25日、日本物理学会 2018年春季年会、東京理科大学野田キャンパス、口頭。
2. 臼田初穂、菱田真史、Elizabeth G. Kelley、齋藤一弥、長尾道弘 「脂質膜構造とダイナミクスに対する添加直鎖アルカンの影響」、2018年12月21日、小角散乱 PF 研究会、高エネルギー加速器研究機構筑波キャンパス、口頭。
3. 臼田初穂、菱田真史、長尾道弘、Elizabeth G. Kelley、山村泰久、齋藤一弥、脂質膜の相転移温度とダイナミクスに対する添加アルカンの影響、2019年10月24-26日、第55回熱測定討論会、近畿大学東大阪キャンパス、口頭。

4. H. Usuda, M. Hishida, E. G. Kelly, Y. Yamamura, M. Nagao, K. Saito, Interleaflet Coupling of *n*-Alkane Incorporated Bilayers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **22**, 5418-5426 (2020). Chosen for the cover art.

* hishida@chem.tsukuba.ac.jp