

博士論文

リン脂質人工モデル膜の構造相転移の回折学的研究

広島大学大学院生物圏科学研究科

上野 聡

目次

第一章 序論

1-1. 脂質膜の物性	
1-1-1. リン脂質膜の二重層膜	1
1-1-2. 脂質膜の相転移	1
1-2. DPPC-水系の物性	
1-2-1. 濃度依存性	3
1-2-2. DPPC-水系の相	
(a) L_c 相	6
(b) $L_{\beta'}$ 相	6
(c) $P_{\beta'}$ 相	8
(d) L_{α} 相	8
1-3. リン脂質-水系に関する温度履歴現象の研究の経緯	9
1-4. リン脂質-水系の前転移に伴う緩和過程に関する研究の動向	12
1-5. 本研究の目的	13

第二章 実験装置および方法

2-1. 中性子およびX線小角散乱の相補性	14
2-2. 回折実験方法および装置(設備)	
2-2-1. 試料条件・温度調節条件および方法	18
2-2-2. X線小角散乱装置(実験室)	23
2-2-3. X線小角散乱装置(放射光)	23
2-2-4. 中性子小角散乱装置	25
2-3. フリーズフラクチャー電子顕微鏡観察法	28

第三章 結果

3-1. 中性子小角散乱測定の結果	
3-1-1. 温度履歴	29
3-1-2. 時間変化	31
3-2. X線小角散乱測定(実験室)の結果	

3-2-1. 時間変化 ($P_{\beta'}$ (mst)相 \rightarrow $L_{\beta'}$ 相) …	35
3-2-2. 時間変化 ($P_{\beta'}$ 相 \rightarrow $L_{\beta'}$ 相) ……	40
3-3. X線小角散乱測定 (放射光) の結果	
3-3-1. 温度履歴 ……	45
3-3-2. リップル相の回折パターン ……	45
3-3-3. 時分割測定の結果 ……	49
3-4. 電子顕微鏡観察の結果 ……	53
3-5. まとめ ……	53

第 四 章 考 察

4-1. リップル相の構造	
4-1-1. $P_{\beta'}$ 相の構造 ……	57
4-1-2. $P_{\beta'}$ (mst)相の構造 ……	59
4-2. リップル相から $L_{\beta'}$ 相への緩和過程	
4-2-1. 結果の整理と解釈の視点 ……	61
4-2-2. 緩和過程に伴うリップル相の 構造変化の様子	
(a) $P_{\beta'}$ 相と $P_{\beta'}$ (mst)相との構造の相違点 ……	62
(b) $P_{\beta'}$ 相と $P_{\beta'}$ (mst)相の構造変化 ……	63
4-2-3. 緩和過程の結果の定性的解釈 ……	63

第 五 章 結 論 ……	65
--------------	----

謝 辞 ……	67
--------	----

付 録	
A. $P_{\beta'}$ 相のリップル周期, 繰返し周期および 角 γ の決定と指数付けの計算 ……	68

表および図の説明 ……	71
-------------	----

参考文献 ……	74
---------	----

第 一 章

序 論

まず脂質膜の物性について触れた後、今回研究を行ったDPPC-水系に関する動的構造研究の現状を報告し、本研究の目的を明らかにする。

1-1. 脂質膜の物性

1-1-1. リン脂質膜の二重層膜

リン脂質は sn-グリセロール 3-リン酸エステルを骨格とし、その 1, 2 位の水酸基に長鎖脂肪酸がエステル結合した構造をとっている。リン脂質は、すべて両親媒性であり、極性の頭部と疎水性の二本の炭化水素鎖から成る尾部がある。コリンを極性頭部に持ち、炭化水素鎖の炭素数 16 のリン脂質、ジパルミトイルフォスファチジルコリン (DPPC) の構造式を図 1-1 に示す。このような両親媒性の分子が過剰な水の環境に置かれると、分子は疎水性の炭化水素鎖を内側に包み込み、親水性の頭部を水と接するように集合する。フォスファチジルコリンのような炭化水素鎖を二本持つ分子では、脂質分子が円柱の形状をしていることから、脂質二重層構造をとった方が安定であることが知られている⁽¹⁾。リン脂質においては、その水に対する溶解度が極めて低いため (10^{-10} M 以下)、層状相と水とが共存する領域が低濃度の領域からつく。極性脂質の集合体の炭化水素鎖の状態は一般に非常にランダムな状態となっているが、長距離構造は比較的規則正しい配列をしている。そこで、炭化水素鎖の状態を α , β , γ などのギリシャ文字、長距離の構造の規則性を L, H などのラテン文字で示すグレコローマン表示法が用いられる⁽²⁾, ⁽³⁾。炭素数、不飽和度の異なったリン脂質フォスファチジルコリンに現れる相を表 1-1⁽²⁾ に示す。

1-1-2. リン脂質膜の相転移

1967年に Chapman ら⁽⁴⁾ が最初に報告して以来、リン脂質膜の構造の相転移は生体系にみられる典型的な物性現象として注目されてきた。構造

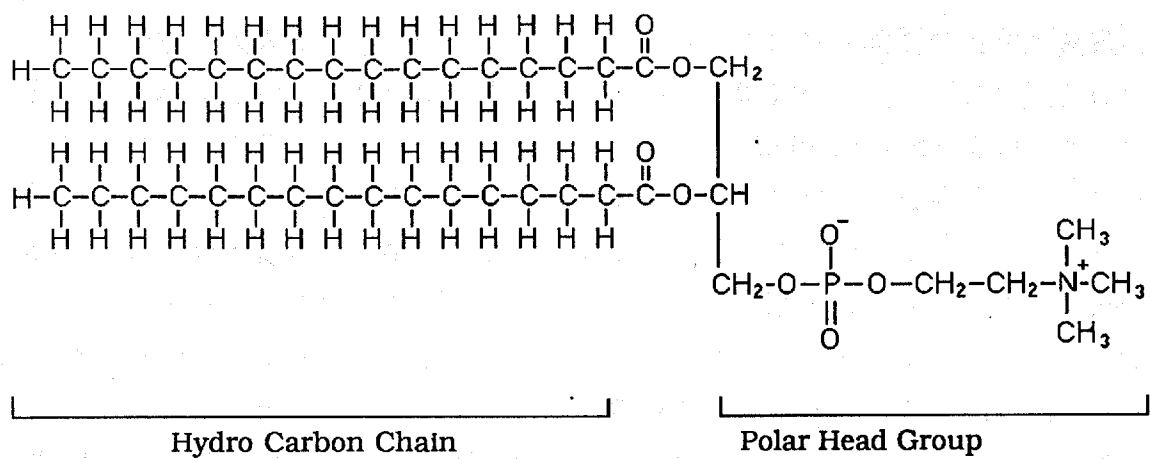


図 1 - 1 . dipalmitoylphosphatidylcholine (D P P C)
の構造式

(炭素鎖数：不飽和度)	H _a	Q _a	R _a	L _a	L _β	L _β '	L _δ	P _β '	P _δ	C
ジラウロイルPC (12 : 0)	+	+		+	-	-	+	+	+	+
ジミリストイルPC (14 : 0)	+	+		+	-	-	+	+	+	+
ジバルミトイルPC (16 : 0)	+	+	+	+	-	+		+	+	+
ジステアロイルPC (18 : 0)	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
ジオレオイルPC (18 : 1)	+	+	+	+				+	-	+

(+) は相の存在を, (-) は不在を示す。PCはフォスファチジルコリンの略。

表 1 - 1 . リン脂質-水系の多形
(A. Tardieu *et al* ⁽²⁾ および香川靖雄 ⁽²⁾ より)

変化の特徴は大きく三つに分類できる。それは(1)リン脂質の炭化水素鎖内部の立体構造変化、(2)炭化水素鎖間の短距離配列の変化、(3)膜自体の長距離構造の変化である。(1)については、低温相では炭化水素鎖はすべてトランス結合による伸びきった構造をしているが、高温相では多くのゴーシェ結合を含み折れ曲がった構造となっている。(2)については、低温相では六方の秩序配列をしているが(図1-2 a⁽¹⁾)、高温相では六方の秩序配列が乱れ、ランダムになる(図1-2 b⁽¹⁾)。(3)については、(1)の変化による炭化水素鎖の膜面に垂直な方向の間隔の変化に伴い、低温相と高温相の間でラメラ構造の繰り返し周期が変化する。またリン脂質の種類によっては、低温相と高温相の間に膜が長波長の規則正しい波打ち(リップル)構造をとる中間相が存在するものもある。

相転移温度は、その物質に固有のもので、リン脂質ではリン酸の先に付く塩基とグリセロールにエステル結合している脂肪酸の種類で決まる。一般に脂肪酸が長くなると相転移温度は上昇し、また脂肪酸に二重結合が入ると相転移温度は著しく低下する。表1-2⁽⁵⁾、⁽⁶⁾にリン脂質二重層膜の相転移温度、エンタルピー変化、エントロピー変化などの熱力学的データを示す。これによれば、脂質の種類によりモル当りのエンタルピー変化およびエントロピー変化は異なるが、メチレン基(H-C-H)当りのエントロピー増加量は脂質の種類によらず0.9 cal/mol/K前後とほぼ一定の値になっている。このことは、転移点 T_m でモルあたりのエンタルピーの増加量 ΔH とエントロピーの増加量 ΔS が著しく、両者は、

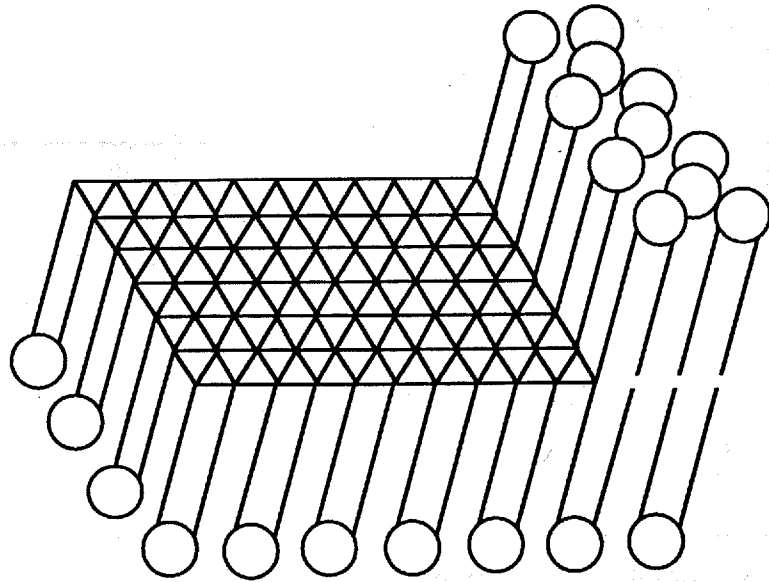
$$\Delta H = T_m \Delta S, \quad \dots (1.1)$$

の関係にあることと考え合わせると、相転移が炭化水素鎖の乱れによることを示している。

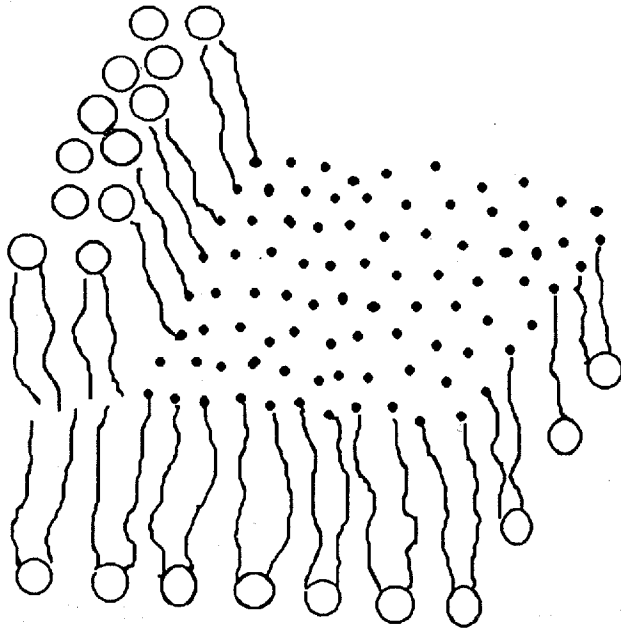
1-2. DPPC-水系の物性

1-2-1. 濃度依存性

図1-3⁽⁶⁾はDPPC-水系の濃度依存性をあらわしている。水の割合が0.1%以上でDPPC-水系を形成し、水の割合が増加するにつれて相



(a) 低温相 (ゲル相)



(b) 高温相 (液晶相)

図1-2. 低温相と高温相における炭化水素鎖の状態
(美宅⁽¹⁾より)

極性頭部の種類	(炭素鎖数: 不飽和度)	転移温度 (°C)	ΔH (kcal · mol ⁻¹)	ΔS (cal · mol ⁻¹ · K ⁻¹)	ΔS (cal · mol ⁻¹ · K ⁻¹ · methylene ⁻¹)
PC	ジラウロイル (12:0)	0.0	4.3	15.8	0.79
	ジミリストイル (14:0)	23.9	5.4	18.2	0.76
	ジパルミトイル (16:0)	41.4	8.7	27.7	0.99
	ジステアロイル (18:0)	54.9	10.6	32.3	1.0
	ジオレオイル (18:1)	-22.0	7.6	30.3	0.95
PE	ジミリストイル (14:0)	49.5	5.8	18.0	0.75
	ジパルミトイル (16:0)	63.5	8.8	23.8	0.85

表1-2. リン脂質-水系の相転移に関する熱測定データ
(大西⁽⁵⁾ およびSmall⁽⁶⁾ より)

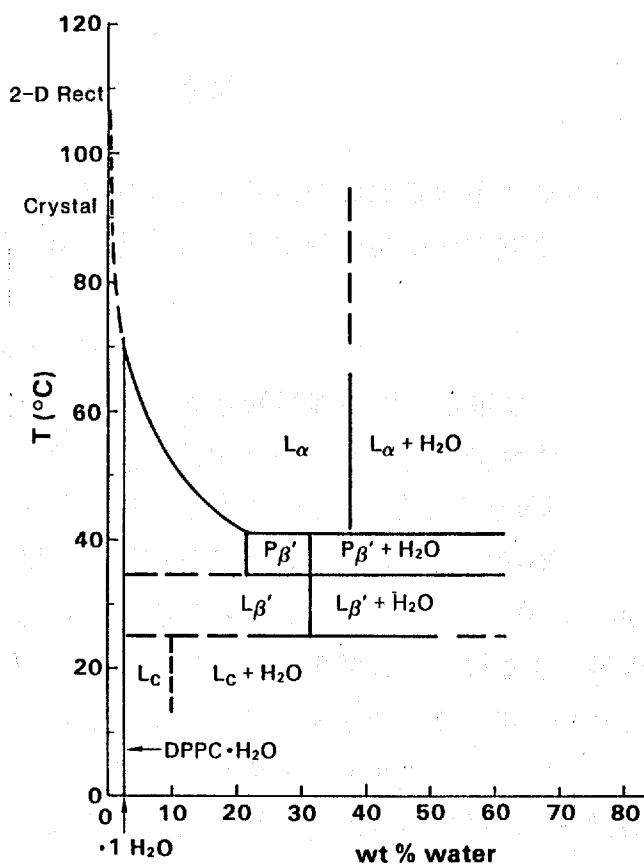


図1-3. DPPC-水系の水濃度依存性
(Small⁽⁶⁾ より)

転移温度が減少し、約20%で一定値(約41°C)に達する。このように水が20%以上含まれる領域では、高温側から順に L_{α} 相、 $P_{\beta'}$ 相、 $L_{\beta'}$ 相、 L_c 相と呼ばれる四つの相と、各相の境界でこの順に主転移(main transition, 約41°C)、前転移(pre transition, 約34°C)、副転移(sub transition, 約13~25°C)と呼ばれる三つの相転移点の存在することが知られている(6)。ただし、副転移点については他の二つの相転移点ほどはっきりせず、研究者によって13°C~25°Cまでさまざまな報告がある(6), (7), (8)。各相の構造等については次節以降で記述する。DPPC-水系において、水の割合を高めていくと膜の繰り返し周期がしだいに増加しやがて一定値に達する。さらに水の割合を高めていくと水の過剰な二相共存状態になる。これが相図の“+H₂O”の付いている相で、膜間の水層の間隔がもはや変化しなくなる。これは膜間にはそれ以上水が含まれないことを意味し、余った水はラメラ構造の外(リポソームの外)に存在することになる。

1-2-2. DPPC-水系の相

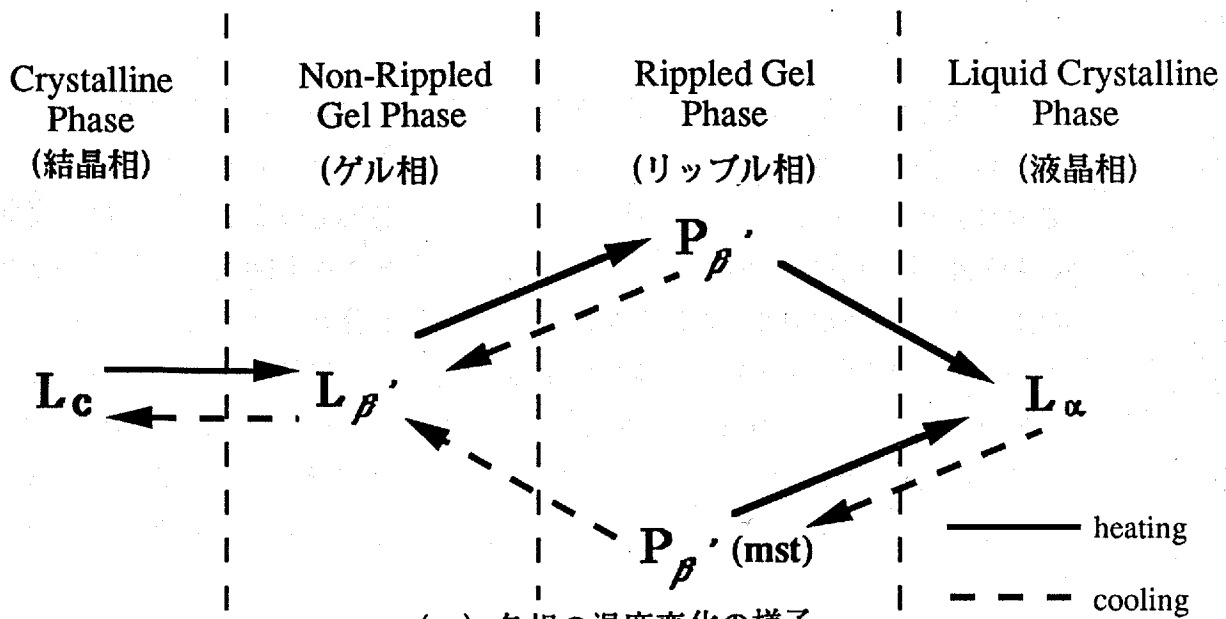
図1-4にDPPC-水系における各相の取り得ると考えられている構造を示す。以下に低温側から順に各相について知られている情報を簡単に記す。

(a) L_c 相(結晶相)

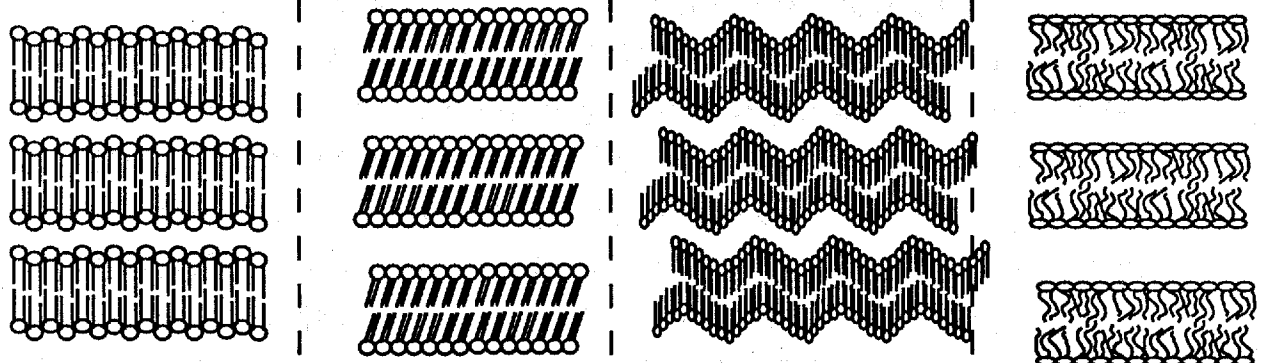
L_c 相は $L_{\beta'}$ 相よりも低温側に現れる相で、結晶相とも呼ばれている。炭化水素鎖は、斜方晶の秩序配列をとり、炭化水素鎖の軸方向は膜面に対し垂直な β 状態をとると考えられている。1分子当りの膜占有面積は 37.9 \AA^2 (9)である。この相は、試料調整後、1ヵ月以上冷蔵庫等の冷暗所におくか(8)、もしくは、 $L_{\beta'}$ 相から氷点下に下げる(9)かしないと現れにくい相である。本研究においても、20°C前後で調製した試料を L_c 相の温度領域(10°C以下)に置いていたことがしばしばあるが、 L_c 相の繰り返し周期に対応する回折ピークは現れず、 $L_{\beta'}$ 相の繰り返し周期と変わりがなかった(後出、図3-16(a))。恐らく非常に長い緩和時間の後に L_c 相に到達すると考えられる。本研究においては、この相に関してはこれ以上触れない。

(b) $L_{\beta'}$ 相(ゲル相)

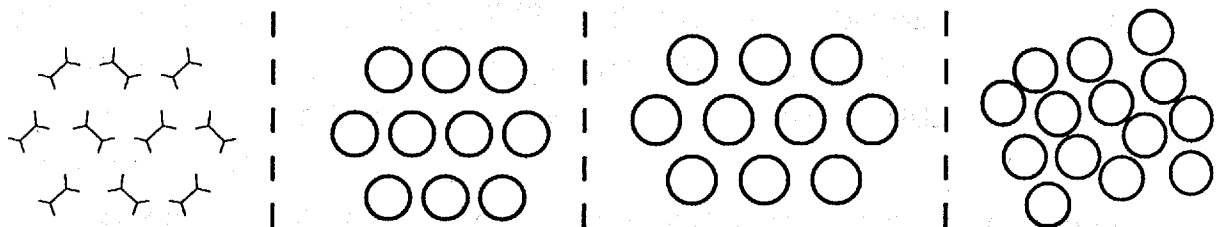
分子内の炭化水素鎖の軸方向は、膜面に垂直な方向に対して一定の傾き



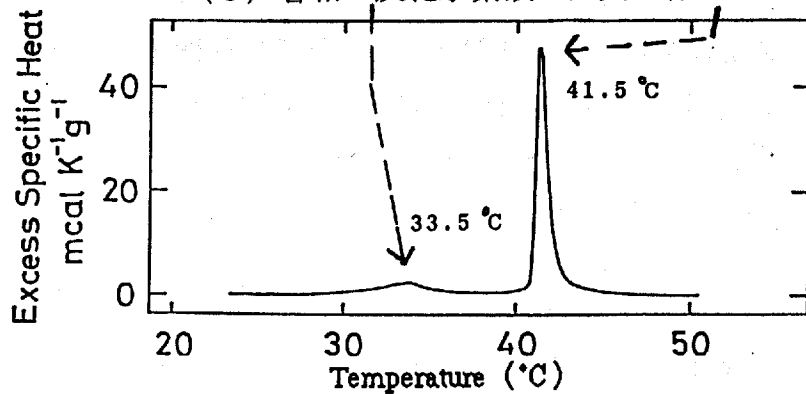
(a) 各相の温度変化の様子



(b) 各相の脂質二重層膜の様子 (断面図)



(c) 各相の炭化水素鎖の配列の様子



(d) 走査型示差熱測定の結果

図1-4. DPPC-水系の相

((c) は Ruocco と Shipley⁽⁹⁾, (d) は Hinz と Startevant⁽¹⁷⁾ より)

角（約34度）をもって規則正しく並んだ β' 状態である。これは実測された二分子層膜の厚さが 47\AA ⁽¹⁰⁾であり、もし炭化水素鎖が膜面に垂直な方向に対して傾きを持たない β 状態であれば二分子層膜の厚さは 56.6\AA であるはずという矛盾を説明するためである⁽⁵⁾, ⁽¹⁰⁾。炭化水素鎖間の配列は六方の秩序配列をとるが、炭化水素鎖軸が膜面に垂直な方向に対して一定の傾き角をもつため、六方の秩序配列は少し歪んでいる。分子の拡散定数は L_α 相に比べて三桁小さい⁽³⁾ ($\sim 10^{-11}\text{cm}^2/\text{秒}$)。1分子あたりの膜占有面積は 39.1\AA^2 ⁽⁹⁾である。この相は、 L_α 相同様に、膜は平らな平面構造をとり、それが何重にも積み重なったラメラ構造をとる。

(c) $P_{\beta'}$ 相（リップル相）

$P_{\beta'}$ 相は、前転移点と主転移点の中間温度領域に現れる相で、炭化水素鎖内部の立体構造に関して現在では低温状態（トランス結合のみの β' 状態）と高温状態（ゴーシュ結合を含む α 状態）の共存状態と考えられている。炭化水素鎖間は六方の秩序配列をとる⁽⁹⁾。炭化水素鎖は、 α 状態と β' 状態を含み、その存在比は、 α 状態1に対し β' 状態4である⁽¹¹⁾。そして、 α 状態の炭化水素鎖が β' 状態の炭化水素鎖の脂質膜中でドメインを形成する。この α 状態の領域で、脂質膜は次々と折れ曲がり、波打ち構造（リップル構造）が形成される。この波打ち構造については、正弦波的な構造をとるとする説⁽¹²⁾と、非対称的なのこぎり波構造をとるとする説⁽¹¹⁾, ⁽¹³⁾があり、議論のあるところである。また、炭化水素鎖が膜面に対して、一定の傾きを持って配向しているという報告⁽¹⁴⁾と膜上の局所的な部分に対して垂直になっているという報告⁽¹⁵⁾があり議論の余地が残されている。波打ちの周期は約 $130\sim 180\text{\AA}$ である。

液晶相（ L_α 相）からリップル相の温度領域まで下げた場合、 $P_{\beta'}$ 相と違った回折パターンが得られる。この状態は24時間を経ても $P_{\beta'}$ 相に戻らない、極めてゆっくりした緩和過程をたどる。X線および熱測定の結果から、Tenchovら⁽¹⁶⁾はこの状態を準安定相、 $P_{\beta'}$ (mst)相と呼び、 $P_{\beta'}$ 相と区別した。この相の構造についてはX線回折や、フリーズフラクチャー電顕法による測定が行われているが、はっきりとした描像はつかめていない。

(d) L_α 相（液晶相）

走査型示差熱測定（DSC）⁽¹⁷⁾によれば、リップル相から液晶相

(L_{α} 相) への転移は吸熱過程である。約 4.1°C の主転移温度において比熱の著しい増加が観測されている (図 1-4 の最下段)。これより転移にともなうエンタルピー変化は表 1-2 より、 8.7 kcal/mol で、1 モル当りのエントロピー変化は 27.7 cal/mol/K である⁽⁴⁾。1-1-2 節で記述したように、この著しいエントロピー増加は主転移が炭化水素鎖の乱れによることを示している。つまり、主転移点での吸熱によって得たエネルギーは、炭化水素鎖が β' 状態から α 状態に変化するのに用いられている。 L_{α} 相では、膜内の炭化水素鎖は α 状態にあり、膜内には流動性があり、この流動性のため、脂質分子間の六方の秩序配列が乱れ、膜面内で自由に拡散する状態にある。その拡散定数は約 $10^{-8}\text{ cm}^2/\text{秒}$ である^{(3), (5)}。膜の厚さは約 35 \AA ⁽¹⁰⁾、1 分子当りの膜占有面積は約 47 \AA^2 ⁽⁹⁾ である。この相が生理条件下の生体膜構造に相当すると考えられる。この相は脂質二重層膜と水とが交互にならんだラメラ相で、繰り返し周期 (脂質二重層膜の厚さ+水の厚さ) は約 $60\sim 65\text{ \AA}$ とリップル相に比べて短い。これは、炭化水素鎖が伸びきった β' 状態から折れ曲がった α 状態へ変化するため、膜の厚さが減少することが繰り返し周期に影響したためと考えられる。

1-3. リン脂質-水系に関する温度履歴現象の研究の経緯⁽¹⁸⁾

好村らは、15年前から回折学的手法により生体膜の研究を行ってきた⁽¹⁸⁾。中性子小角散乱法の開発が進み、データがとれるようになった段階で、データの信頼度を確かめる意味で、構造がよく知られ、簡単であり、解析も比較的容易な単一膜リボソームの測定を行い、その内径および外径が既知の値とよい一致を得ている⁽¹⁹⁾。この後、彼らは、卵黄レシチンや脂質一成分および二成分+水系の様々な条件下での構造研究を行った。このうち、脂質一成分+水系の研究においては次のような問題点が生じている。中性子小角散乱法による DPPC- D_2O 懸濁液の温度変化に伴う構造変化の測定において、 47°C では膜間隔の繰り返し周期 $d = 68\text{ \AA}$ に対応する鋭い一次の回折ピークが $Q \sim 0.1\text{ \AA}^{-1}$ に観測されたが、 28°C でははっきりとした回折ピークがなくなり、 $Q < 0.08\text{ \AA}^{-1}$ の領域に強い散漫散乱が現れ、 $Q \sim 0.1\text{ \AA}^{-1}$ での強度が $Q = 0.08\text{ \AA}^{-1}$ での強度より減少している (図 1-5)⁽²⁰⁾。これに対し X 線小角散乱法による DPPC- H_2O 系の測定結果によれば上記のような散漫散乱は現れず、はっきりとした回折線が 4 次まで観測できた。

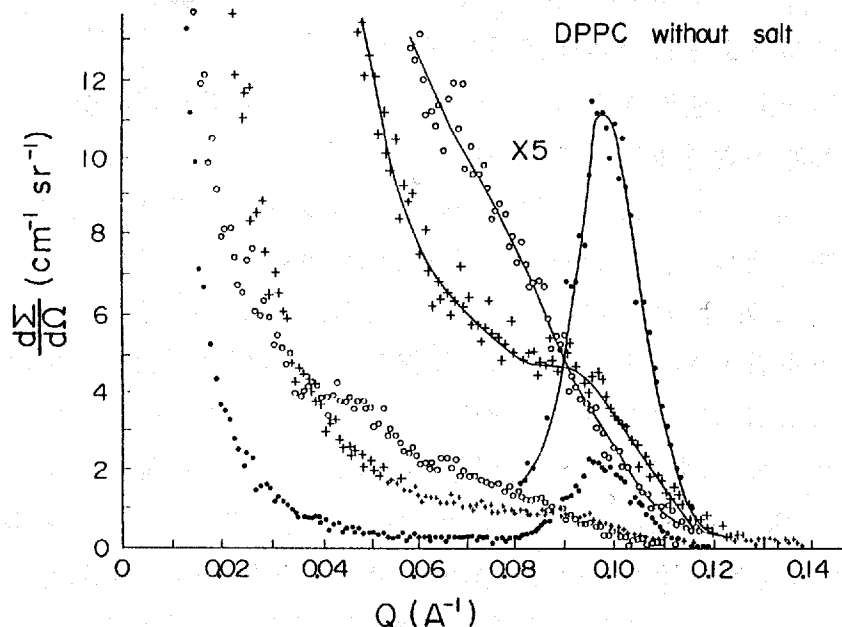


図1-5. DPPC-D₂O系の中性子小角散乱パターン
 DPPC : D₂O = 20 wt% : 80 wt%
 ● : 47.8°C, ○ : 35.4°C, + : 27.8°C
 (武田ら⁽²⁰⁾より)

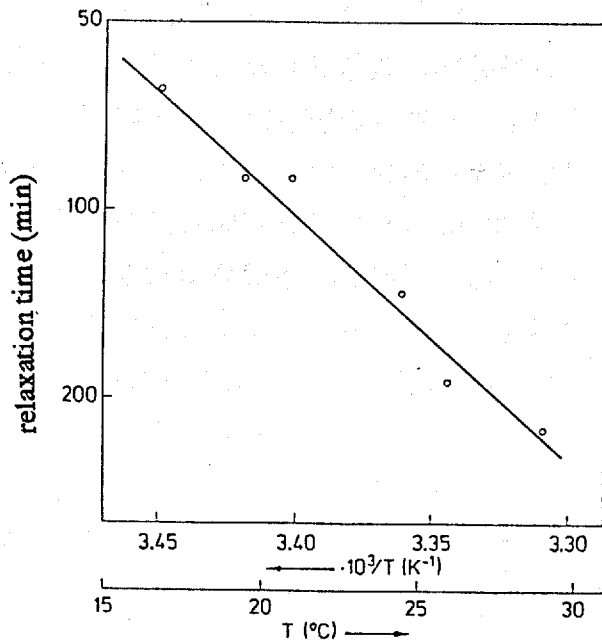


図1-6. 37°Cから急冷した場合のL_{β'}相の
 緩和時間の温度依存性 (Laggner⁽²⁷⁾より)

彼らは、このような中性子とX線の測定結果の差異は、溶媒の違い (D_2O と H_2O) であると考えて、DPPC- D_2O 系についてもX線小角散乱測定を行ったが、X線によるDPPC- H_2O 系の測定結果と有意の差は観測されなかった⁽²⁰⁾。さらに彼らは、同じ試料条件にあるように注意してX線および中性子小角散乱測定を繰り返したが、これまで同様に互いに矛盾する結果が得られた。またX線および中性子における脂質二重層膜の形状因子の相違により測定結果に相違が生じるという説明も試みられた⁽²⁰⁾。

これまではDPPCを温水 (約 $50^\circ C$) に懸濁させていた、即ち L_α 相においてDPPC- D_2O 系およびDPPC- H_2O 系試料を調製していたが、DPPCを冷水 (室温) に懸濁させて調製した試料を用いて中性子小角散乱測定を行ってみた。その結果、最初に測定した室温 (約 $25^\circ C$) における測定において、これまで観測されなかった繰返し周期に対応する回折ピークが出現した。そして徐々に L_α 相まで加熱した後、再び室温まで冷却して測定した時、 P_β' 相として知られていたリップル相の領域において加熱と冷却の過程で散乱パターンの異なる履歴現象が観測された (後出、図3-1)⁽²¹⁾。また冷却過程において室温で測定した時、以前の測定で得られていたのと同様に、繰返し周期に対応する回折ピークは現れず、 $Q < 0.08 \text{ \AA}^{-1}$ の領域に強い散漫散乱のある散乱パターンが現れた。さらに、そのまま室温で数時間放置した後の測定においては、最初の測定で観測された回折ピークが出現した。このことから冷却過程において室温付近における構造の緩和過程の存在が示唆された。

上記のように温度履歴と緩和過程の存在は、中性子とX線の異なる測定結果の理由を明らかにした。即ち、中性子の測定で室温付近 ($28^\circ C$) で回折ピークが現れなかったのは試料調製を L_α 相の温度領域で行い、この相から冷却したため、 $28^\circ C$ での測定は緩和過程の初期の様子を測定していたので回折ピークが出現していなかったと考えられる。そしてX線において試料調製を L_α 相の温度領域で行ったにもかかわらず室温付近で4次まで回折ピークが出現しているのは、X線の測定は写真法であったため、一つの測定に数時間かかる。このため、測定の間には緩和過程が進行し写真に回折ピークに対応するリングが出現したと考えられる。

以上のような経過を経て、リップル相における温度履歴と L_β' 相における緩和過程の解明がその後の興味ある課題となった。

1-4. リン脂質-水系の前転移に伴う緩和過程に関する研究の動向

前転移の動力学は、主転移同様に、リン脂質多重層膜リポソームについて様々な手法により研究されてきた(22) - (27)。

Lentzら(22)は、蛍光偏向解消法を用いてDPPCの前転移の緩和現象を測定した。その結果、この緩和現象は加熱および冷却速度により緩和時間が異なるが、最も確実なのは緩和時間が 5 ± 2 分の範囲であると指摘した。

Choら(23)は、示差走査熱量測定(DSC)を用いて、DPPCおよびDMPCリポソームの前転移の緩和現象を研究した。かれらは、前転移温度付近の転移の緩和時間を見積もった。その結果、緩和時間は前転移温度付近でより長くなること、また P_{β}' 相から L_{β}' 相への転移は一つの緩和過程では解析され得ないことを結論した。

秋山ら(24)はX線回折法を用いてDMPCについて調べた。それによると、 P_{β}' 相から L_{β}' 相への前転移は、温度変化後7分以内で90%が終了する。しかしそのX線ブラッグ反射線はより長い緩和時間で鋭くなることが見出された。

槌田ら(25)は、スピンプローブ(TEMPO)を用いた電子スピン共鳴(ESR)により、DPPCリポソームの前転移の動力学を調べた。彼等は、 P_{β}' 相から L_{β}' 相へ、あるいは L_{β}' 相から P_{β}' 相へ温度ジャンプさせた。温度変化後一定温度に保った状態での平衡状態への緩和過程は、水と脂質の相間のTEMPOの分布変化を測定することにより観測を行った。その結果、二つの緩和時間が見出され、どちらの緩和時間も前転移点に近づくにつれて長くなることが見出された。その後、彼らは(26)、フリーズフラクチャー電顕法を用いて、DPPCリポソームの前転移の動力学をESRによる研究と同じ条件により調べた。リップル構造の形成と消滅は前転移点近くの緩和過程に密接に関係していることを指摘した。

武田ら(21)は、中性子回折法により、 L_{α} 相からリップル相(P_{β}' (mst)相)へ急冷した際、その回折パターンに大きな変化が生じ、履歴現象の存在を見出した。また、降温過程において、リップル相(P_{β}' (mst)相)のまま、24時間放置しても、その散乱パターンに変化の生じないことを示した。更に、このリップル相(P_{β}' (mst)相)の状態から L_{β}' 相の温度領域に急冷したときに、 L_{β}' 相の構造に相当する回折ピークの出現する緩和過程を観測した(第三章参照)。

Laggner⁽²⁷⁾ は、X線回折法により、DPPCリポソームの P_{β}' 相から L_{β}' 相へ急冷した後の時間変化を様々な温度で測定した。その結果、 L_{β}' 相の温度領域においては、 L_{β}' 相の緩和は前転移温度に近づくにつれて長い時間を要することを見出した。そして、その反応速度定数は急冷するときの温度差により指数関数的に増えることを指摘した(図1-6)。

以上、前転移の動力学に関して、温度履歴および緩和現象の存在が指摘された。これらの研究によれば、リン脂質膜の動的構造変化の様子についてはっきりとした描像がいまだに明らかではないが、履歴現象や緩和過程の存在は本質的にリップル相の構造に起因していると考えられる。

1-5. 本研究の目的

以上を踏まえて、本研究では、DPPC-水系の温度変化に伴う静的構造変化およびリップル相から L_{β}' 相への温度変化にともなう動的構造変化を、回折学的方法を用いて明らかにするとともに、このことより、リップル相(P_{β}' 相および P_{β}' (mst)相)の構造を明らかにすることを目的とする。そして、動的構造変化についてのモデルをたて、回折学的方法により得られた測定結果を理解することを試みる。

第二章

実験装置及び方法

まず、なぜ中性子とX線の両方で測定するのか、どういう有利な点があるのかについて触れた後に、本研究の実験条件・実験方法および用いた実験装置を説明する。そして最後にフリーズフラクチャー電子顕微鏡法について触れる。

2-1. 中性子及びX線小角散乱の相補性 (20)

X線及び中性子小角散乱法は、物質の数十Å~数百Åの構造を「見る」手段として非常に有効である。多重膜リポソームは、脂質二重層膜と水層とが交互に何重にもなったラメラ構造を形成しており、膜面に垂直方向に繰り返し周期 d が存在する。このため結晶構造をもつ場合と同様にBragg反射による回折ピークが出現し得る。X線および中性子の波長を λ 、散乱角を 2θ とすると、Braggの法則

$$2d \sin \theta = n \lambda \quad (n = 0, 1, 2, 3, \dots), \quad \dots \quad (2.1)$$

より面間隔 d が求まる。ここで d は多重膜リポソームのラメラ構造の繰り返し周期に相当する。この繰り返し周期 d は濃度と温度に伴う変化はあるが、だいたい60~70Åである。したがってX線回折の場合、波長 λ は約1Åなので、その回折角は(2.1)式より、1度以下の小角散乱となる。

中性子とX線の両方で測定する利点は、脂質二重層膜の測定にとって、二つの測定が互いに相補的であることである。図2-1(a),(b)はそれぞれX線に対するDPPC-H₂O系および中性子に対するDPPC-D₂O系の脂質二重層膜の膜面に垂直な方向 x の散乱振幅密度関数 $\rho(x)$ である。散乱振幅密度関数 $\rho(x)$ は一般に次式のように表現される。

$$\rho(x) = \sum_i \rho_0(x - x_i) = \int \rho_0(x - X) \cdot \sum_i \delta(X - x_i) dX,$$

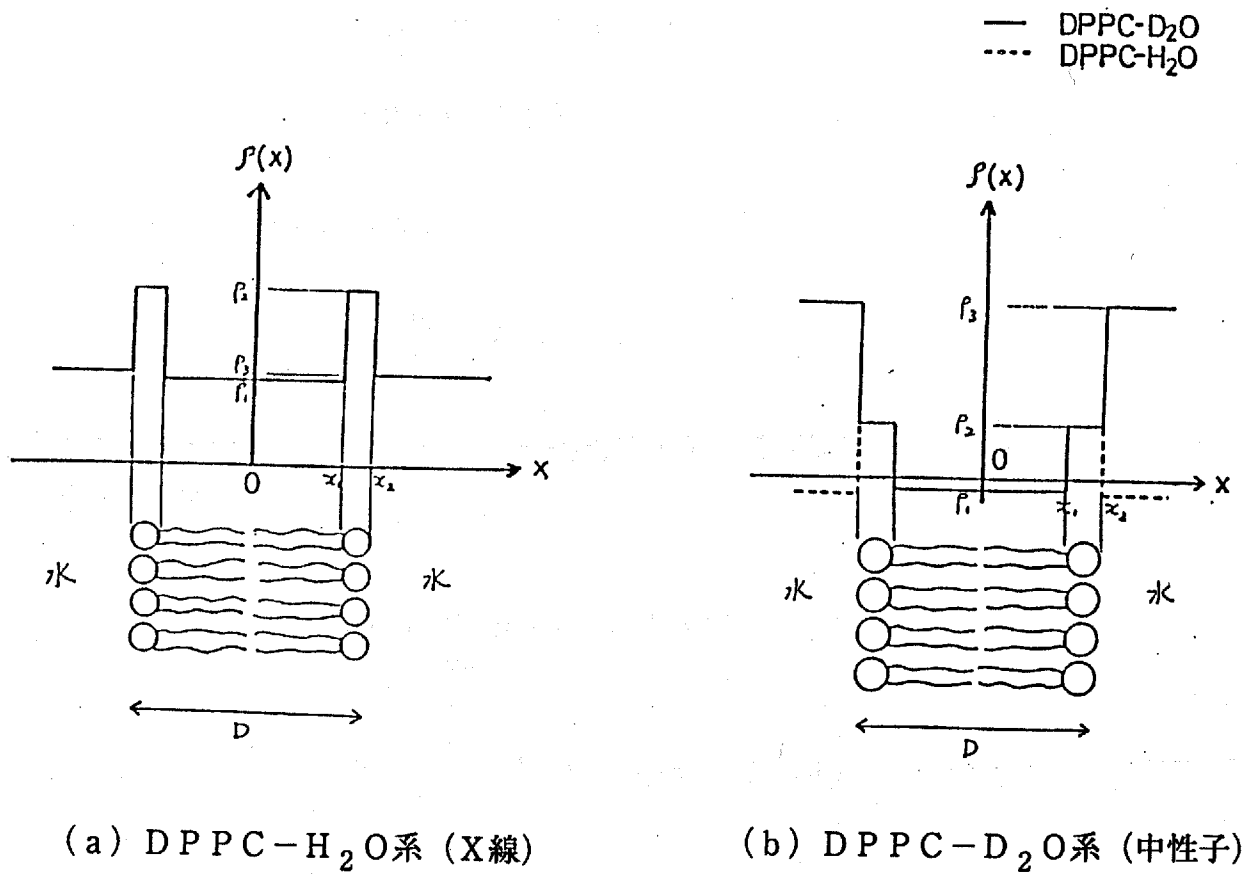


図2-1. 脂質二重層膜の膜面に垂直な方向の
散乱振幅密度関数 $\rho(x)$

ここで $\rho_0(x)$ は一つの膜の膜面に垂直な方向の散乱振幅密度関数であり、 x_i は各膜の中心の存在する、膜面に垂直な方向での、位置をあらわす。この $\rho(x)$ をもとに、水中における中性子と X 線に対する二重層膜からの散乱強度を I とすると、

$$I = \left| \int_{-\infty}^{\infty} \rho(x) \exp(i Q x) dx \right|^2 \dots (2.2)$$

$$= |S(Q)|^2 \cdot |F(Q)|^2 ,$$

ここで、 Q は散乱ベクトル

$$Q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\theta ,$$

であり、 $S(Q)$, $F(Q)$ はそれぞれ膜内構造因子、膜間構造因子であり、次式で与えられる。

$$S(Q) = \left| \int_{-\infty}^{\infty} \rho_0(x) \exp(i Q x) dx \right| , \dots (2.3)$$

$$F(Q) = \left| \int_{-\infty}^{\infty} \sum_i \delta(x - x_i) \exp(i Q x) dx \right| ,$$

たとえば膜が一定間隔 a で揃っているときには、 $F(Q)$ は、

$$F(Q) = \sum_h \delta(Q - hQ_0) ,$$

となり、 hQ_0 の位置 ($Q_0 = 2\pi/a$, h は自然数) に回折ピークが現れる。この回折ピークは、膜の間隔に乱れが生じると強度が下がり、幅を持つぼやけた形になる。さらに膜間隔が乱れ、周期性がなくなると回折ピークは消滅する。

膜内構造因子を計算し、散乱ベクトル Q の関数としてプロットしたのが図 2-2 である。矢印は繰り返し周期に対応する一次の回折ピークの位置を示

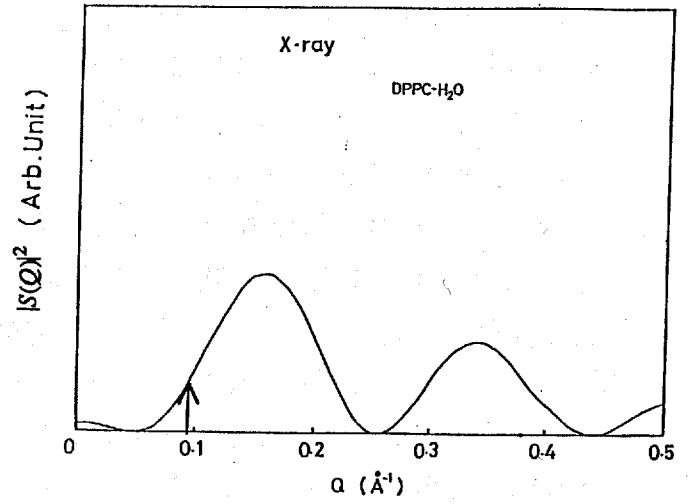
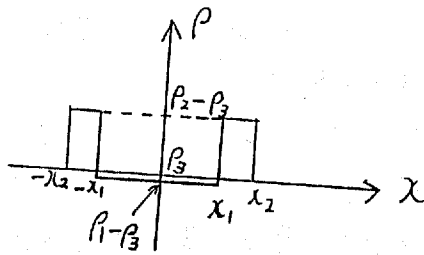


図 2 - 2. (a) 脂質二重層膜に対する X 線の散乱強度の計算値

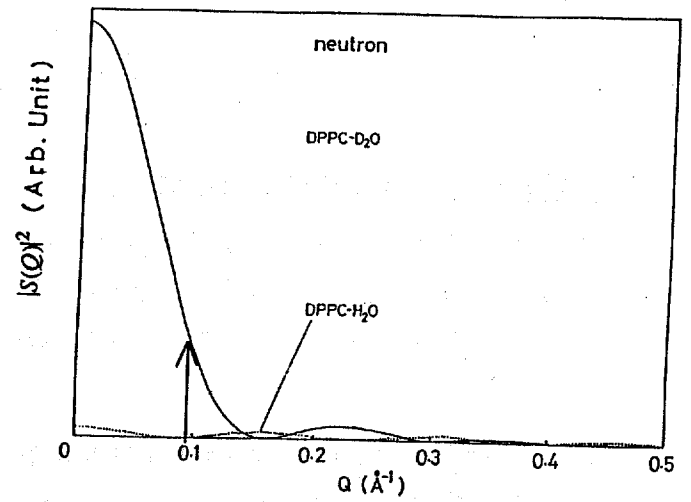
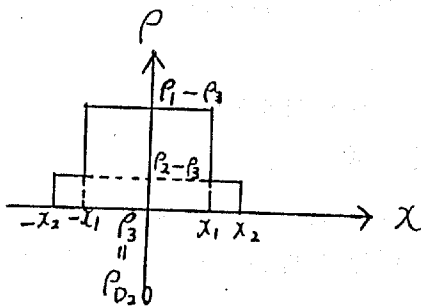


図 2 - 2. (b) 脂質二重層膜に対する中性子の散乱強度の計算値

す。このモデル計算によれば、X線では一次のピーク（図2-2の矢印）よりも Q の小さい領域での強度は極めて小さいが、 Q の大きい領域で強度が上がっている（図2-2（a））。これに対し、中性子では一次の回折ピーク（矢印）よりも Q の小さい領域で強度が大きい（図2-2（b））。つまり、脂質二重層膜の多重構造に対して、中性子の測定は Q が一次のピークよりも小さい領域で敏感なのに対し、X線の測定は Q が一次のピークよりも大きい領域で敏感である。例えば、X線では $Q = 0.05 \text{ \AA}^{-1}$ 付近の情報が得られないが、中性子では $Q = 0.05 \text{ \AA}^{-1}$ 付近の強度分布から多重構造の情報が得られる。逆に $Q > 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ では、中性子は強度が小さいのに対し、X線では強度が大きくなる。したがって、 Q の領域により中性子が有用な領域とX線が有用な領域があり、中性子、X線どちらか一方のみによる測定よりも多くの情報が得られる。X線と中性子散乱の散乱パターンの違いは、このように水中における脂質二重層膜の散乱振幅密度の違いにもとづく構造因子の差異が起因していると思われる。

2-2. 回折実験方法および装置(設備)

2-2-1. 試料条件・温度調節条件および方法

試料はリン脂質DPPCを用いた。この理由は、DPPC分子が電氣的に中性であるので理論的に扱い易いこと、そしてDPPCはこれまで多くの研究者によって調べられ、水との二成分系の相図等の基礎的な物性が明らかになっているため、さらに進んだ構造相転移に関する研究が行い易いことが挙げられる。

L- α -DPPCを米国のSigma社より購入し（純度99%）、これを精製せずに、そのまま水に加えて懸濁させ、40wt%溶液を作った。なお中性子小角散乱測定では重水（ D_2O ）を、X線小角散乱測定では軽水

（ H_2O ）を溶媒として用いた。これを気泡が入らないように試料容器に詰め、試料の温度調節用ホルダー（図2-3）に試料容器を入れた。X線回折（実験室）では（図2-3（a））、試料の厚さは1mmで、X線を透過させる窓には厚さ0.05mmのポリアミド膜（カプトン）を用いてある。X線回折の測定においては、厚さ1mmの試料の他に窓として用いたカプトン（0.05mm厚×4枚）と温度制御用の温水層（実験室の測定では0.5mm厚×2

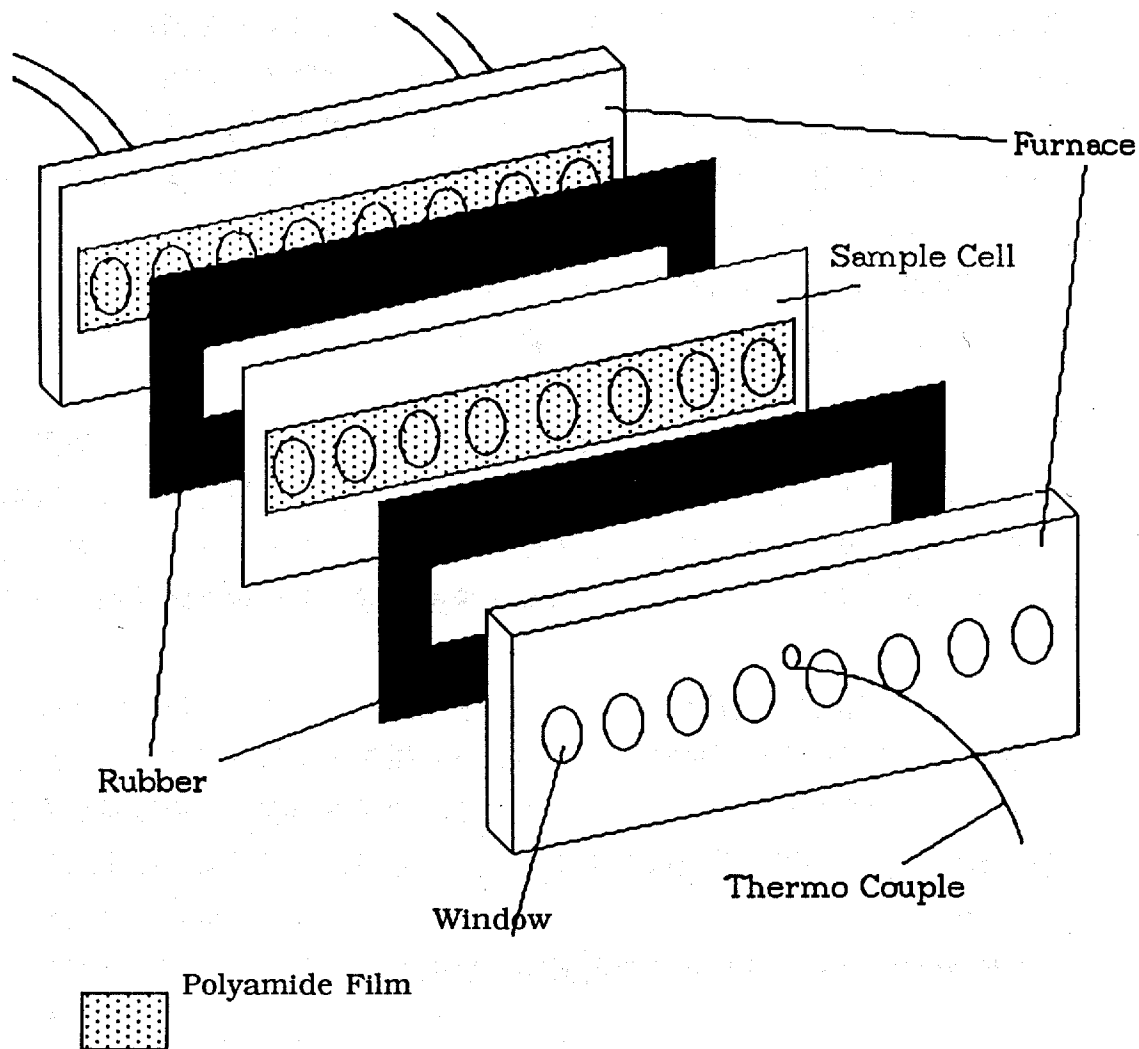


図 2-3. (a) X線回折用サンプルホルダー

層、放射光の測定では1 mm厚×2層)を透過させる(図2-3(b))。中性子回折では(図2-4)、厚さ2 mmの石英ガラスセルを用いてある。温度調節用ホルダー内は、X線回折・中性子回折いずれの場合も中空になっており、ホルダー内中空部分に恒温槽から冷または温水を循環させた。試料の温度調節は恒温槽から温度調節用ホルダーに循環する冷または温水の温度調節により行った。この恒温槽は、5℃から70℃の範囲で自在に水の温度を調節できる。試料の温度は、中性子回折ではアルメル・クロメル熱電対を試料に直接浸して、またX線回折では試料の窓の一つを水で満たし、その中に熱電対を入れて測定した。

実際の測定では、温度変化または時間変化にもとづく回折パターンの変化の測定を行った。測定時間は、中性子の場合一回につき500秒、X線(実験室)の場合7.5 kWの出力で一回につき600秒、X線(放射光)の場合一回につき時分割測定(速い緩和現象の測定)が7秒、それ以外は60秒である。

温度変化過程の測定は、室温で作った試料をまず徐々に温度を上げて主転移点(41.5℃)以上まで温度を上げた。この加熱過程の途中で28℃、35℃など何点かで一時的に温度を安定させた測定点を設けて測定した。次に主転移点以上から前転移点(約34℃)以下までの冷却過程の測定をやはり数箇所の測定点で測定した。

時間変化は次の二通りの方法で、前転移点以下(L_{β}' 相)での時間変化を追跡した。

(1) P_{β}' 相から L_{β}' 相への温度変化の測定では、まず試料の温度を低温(室温)から前転移点と主転移点の中間の温度領域、すなわちリップル相の温度領域に上げ、このリップル相の温度領域から前転移点以下の L_{β}' 相の温度領域に急冷した後、一定温度に保ち時間変化を見た。

(2) P_{β}' (mst)相から L_{β}' 相への温度変化の測定では、試料の温度を室温からリップル相の温度領域に上げる。ここからさらに主転移点以上、すなわち L_{α} 相の温度領域に温度上昇させる。次に L_{α} 相の温度領域からリップル相の温度領域へ急冷し、最後にリップル相の温度領域から L_{β}' 相の温度領域に下げた後、一定温度に保ち時間変化を見た。

なお各相を安定させるため(1)、(2)の場合ともに各温度変化操作はそれぞれの温度到達後10分間放置した後に行った。温度の下げ方は上記のように冷・温水を循環させることにより温度調節容器に試料容器を入れたまま

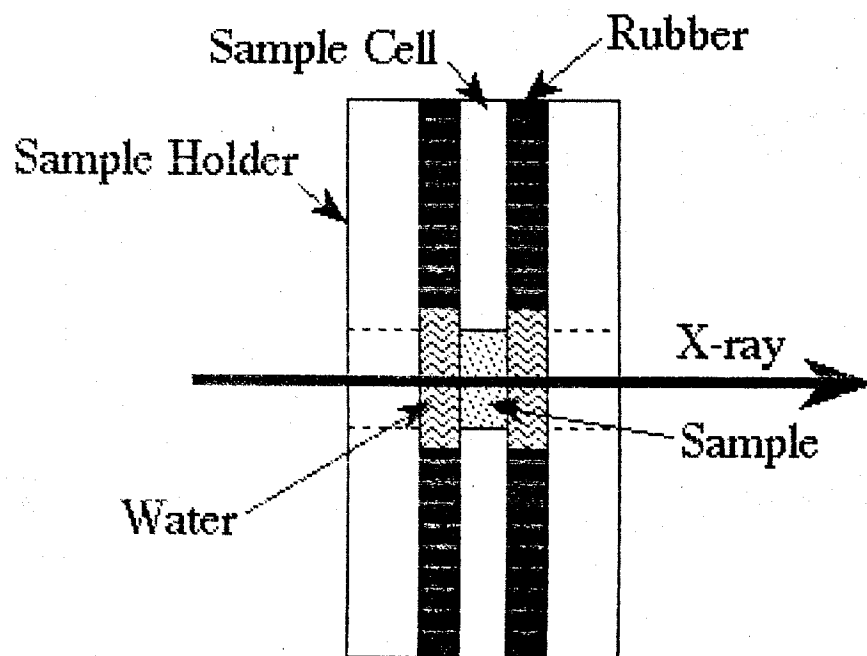


図2-3. (b) X線回折用サンプルホルダーの断面図

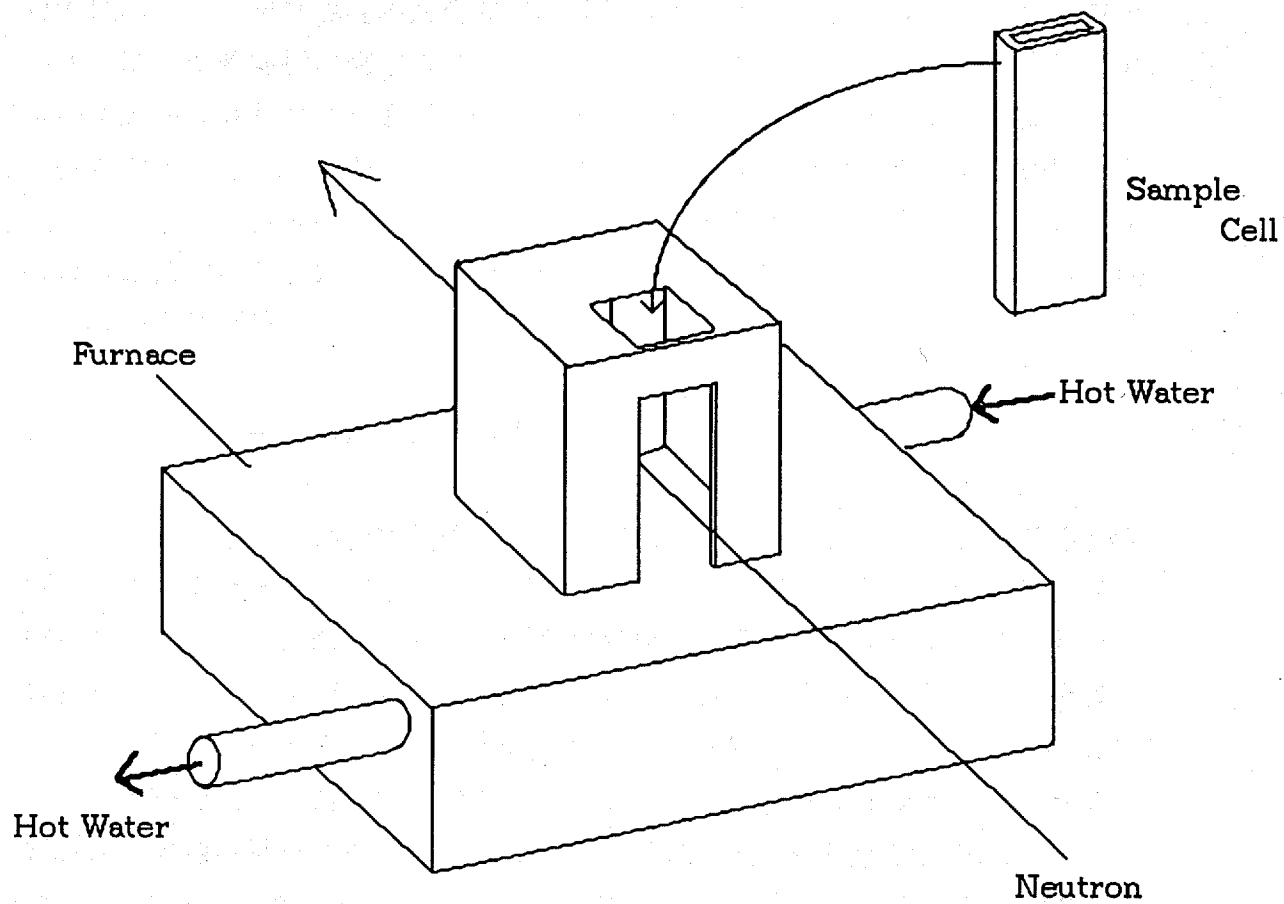


図 2 - 4 . 中性子回折用サンプルホルダー

下げた。ただし中性子による測定については温度調節用容器（図2-3（b））の構造上、冷または温水の循環による温度変化が比較的遅いため、温度調節容器から取り出して、あらかじめ設定された温度の水に試料容器を一分間つけて急激に冷却し、再び温度調節容器に取り付けることにより急冷した。温度降下の割合は、X線回折の測定ではどの測定も始めの約15秒が30～50℃/分、次の45～60秒が3～8℃/分である。一般に温度差が大きいほど温度降下の割合が大きく、したがって12℃や15℃の測定の場合が温度降下の割合が大きく、30℃付近の測定では温度降下の割合が比較的小さかった。急冷後2分以内にはどの測定においても目標温度の+0.5℃以内に収まり、5分以内に目標温度に到達した。

2-2-2. X線小角散乱装置（実験室）

図2-5にX線回折装置系を示してある。これは、（1）X線発生装置、（2）点収束カメラ、（3）真空パス、（4）一次元位置敏感比例計数管から成り立っている。X線発生装置は回転対陰極X線管（理学電機ロータフレックスRU-200）を用いた。ターゲットとしてはCuを用い、X線の波長はCuK α 線、波長 $\lambda=1.542\text{ \AA}$ を使用した。線源から発散していくX線はガラスミラーを用いて計数管上で線収束するようにし、ダイレクトビームおよび試料からの散乱波は真空パスを通り、散乱波は一次元位置敏感比例計数管（Position-Sensitive Proportional Counter, P S P C）に入る。入った位置の情報は電気信号に変換され検出される。ダイレクトビームはP S P C直前に設置した幅約2 cmのビームストッパーによりカットした。さらにP S P Cとビームストッパーの間に幅5 mmのスリットを入れた。使用したP S P Cは、マックサイエンス社の直線型P S P Cで、有効長は50 mm、位置分解能は約1 mm、最高計数率は 2×10^4 cpsである。

2-2-3. X線小角散乱装置（放射光）（28）

放射光はつくば市にある高エネルギー物理学研究所放射光実験施設（Photon Factory）のビームラインBL-15Aステーションを利用した。このステーションの装置は、光源から高輝度の単色X線を取り出すことのできる収束型X線光学系と、高速一次元P S D（Position Sensitive Detector）を用いた時分

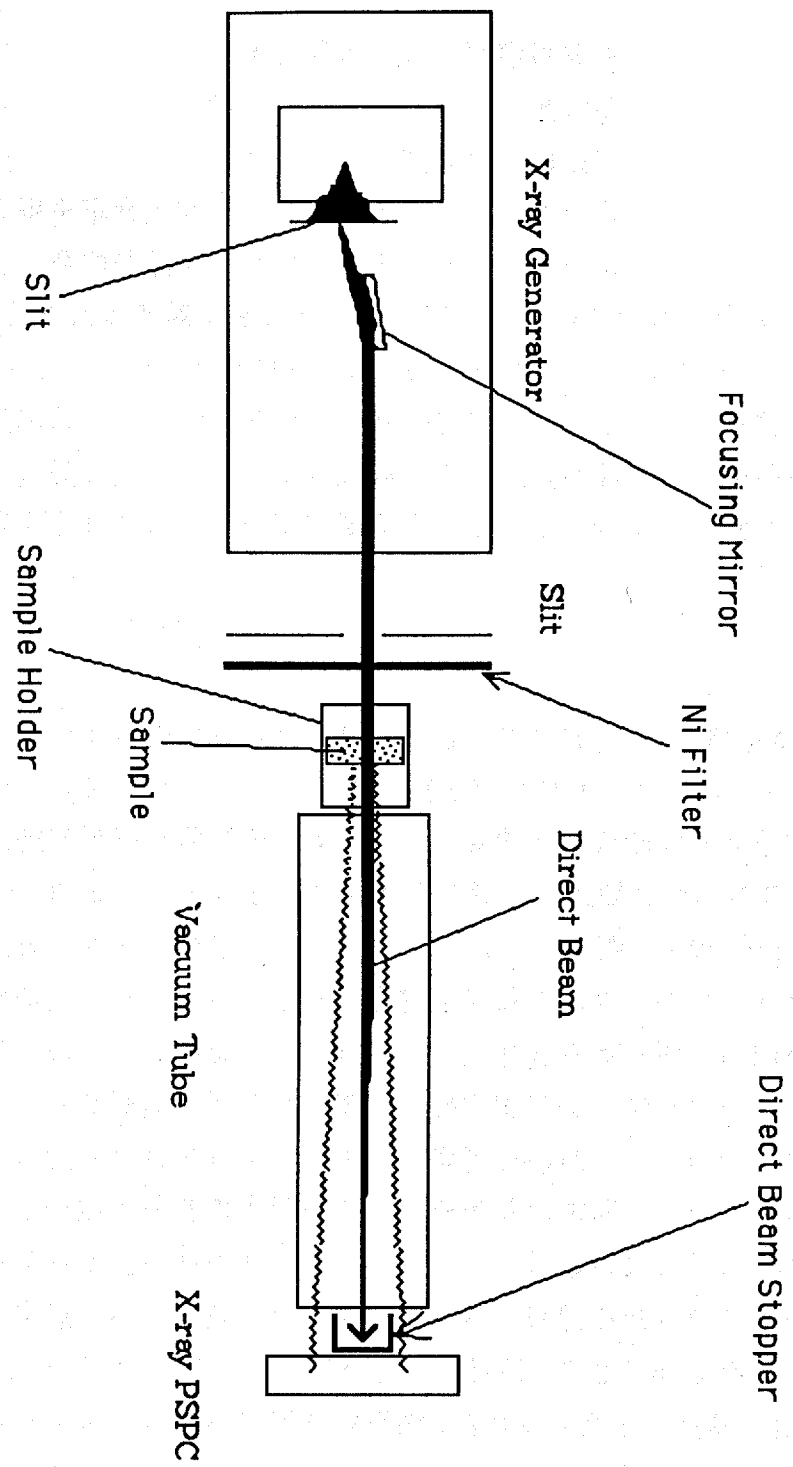


圖 2 - 5. X線回折装置系 (實驗室)

割X線計測系が設置されている。本装置の大きな特徴は実験室のX線小角散乱よりも100倍以上の高輝度が得られるので、数秒程度の高分解能の時分割測定が可能である点である。図2-6(a)に収束型小角散乱光学系の概観を示す。光源からのX線を垂直方向および水平方向に収束させるためにそれぞれ、湾曲全反射ミラー、湾曲結晶モノクロメーターを用いている。X線の波長は 1.5 \AA を用い、得られるX線強度はリング電流100 mAの時、約 $3 \times 10^{10} \text{ cps}$ である。また、単色度は $\Delta\lambda/\lambda \sim 3 \times 10^{-3}$ である。一次元位置敏感型X線検出器(一次元PSD)の有感長は20 cm、位置分解能は約0.4 mmである。図2-6(b)には放射光実験施設における測定系および温度制御系の配置を示している。温度制御は2-2-1節に示した通りである。

2-2-4. 中性子小角散乱装置(29)

図2-7に中性子回折装置系を示してある。これは、(1)原子炉、(2)中性子速度選別機、(3)コリメーター系、(4)フライトチェンバー、(5)中性子一次元位置敏感比例計数管から成る。この装置系は京都大学原子炉実験所(Kyoto University Reactor, KUR)の中性子導管室に設置した。この原子炉の最大出力は5 MWで最大出力時に $8 \times 10^{13} / \text{cm}^2 / \text{秒}$ の中性子束を放出する。中性子束は全長10.8 mの中性子導管を通過する間に約 2.85 \AA の波長以上の冷中性子のみがこの導管内部表面を全反射しながら導管出口へ到達し、その他の熱中性子及び速中性子等は導管の途中で導管を突き抜け、導管を覆っている吸収体に吸収されてしまう。中性子導管を通過した冷中性子は中性子速度選別機により一定の速度の中性子だけに機械的に選別される。この装置内部にある回転ドラムが高速回転することにより、回転数に対応した波長の中性子のみがこの中を通り抜け、選別されて出てくる。選別された中性子の波長分解能 $\Delta\lambda/\lambda$ は、半波高における全幅値(FWHM)で約14%である。我々はドラムの回転数を4800回転に保ち波長約 4 \AA の冷中性子を実験に使用した。試料からの散乱波はフライトチェンバーを通過して中性子一次元位置敏感比例計数管(PSPC)により位置の情報を電気信号に変換する。中性子カウンターはイギリスのHarwell製造のものを用い、内径5 cm ϕ 、有効長50 cmである。内部は ^3He が8 barで満たされており、位置分解能は0.62 cmである。

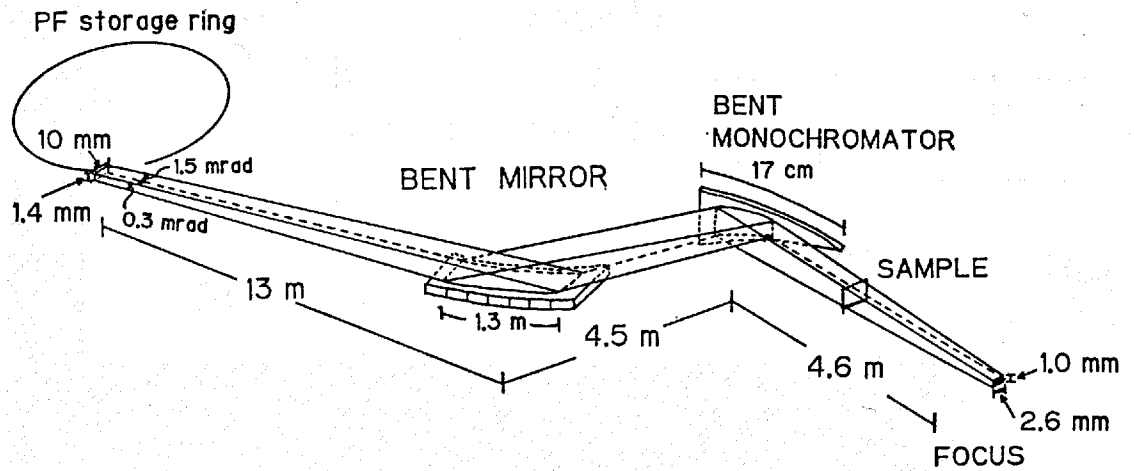


図 2 - 6. (a) 放射光実験施設における X 線回折装置系の概観
(雨宮⁽²⁸⁾より)

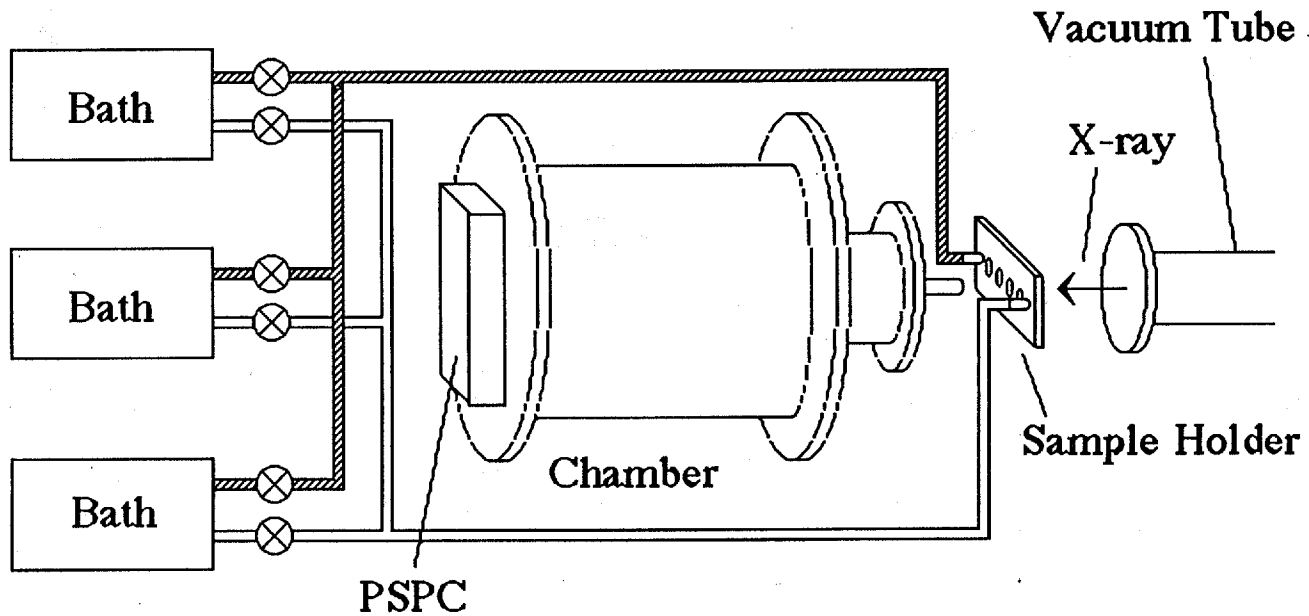


図 2 - 6. (b) 放射光実験施設における測定系および温度制御系の配置図

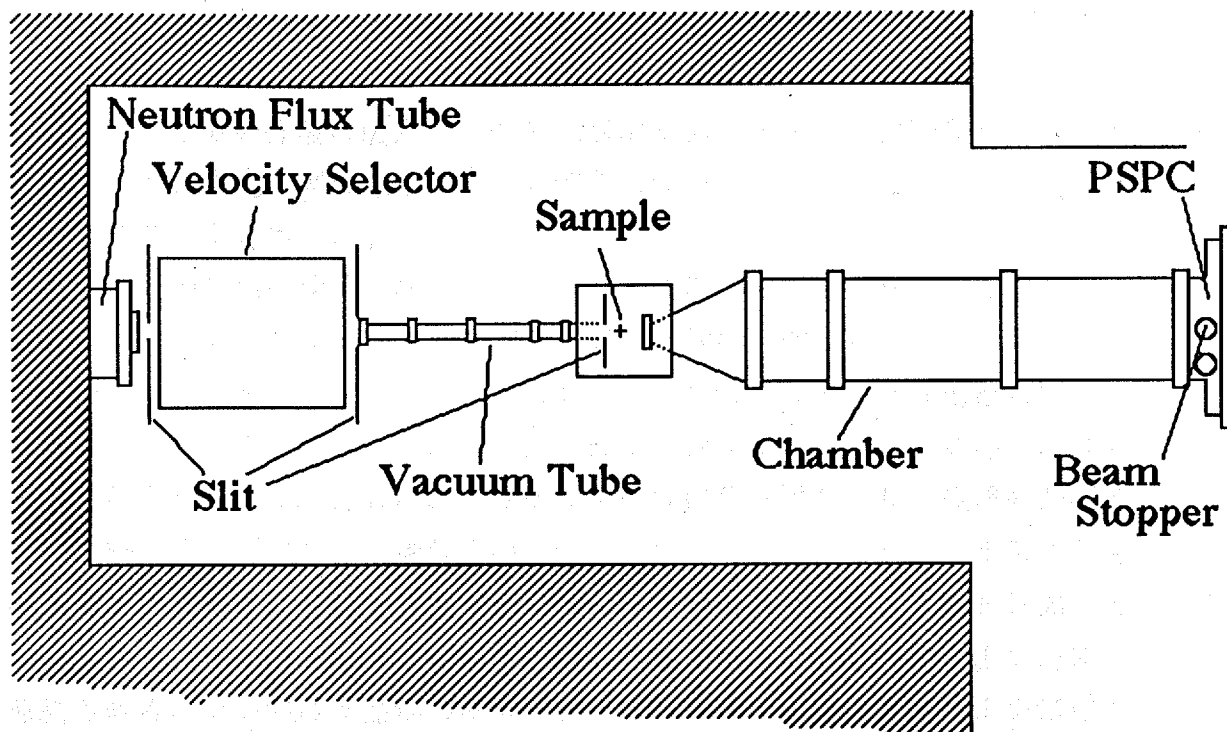


図 2 - 7. 中性子回折装置系 (好村ら⁽²⁹⁾より)

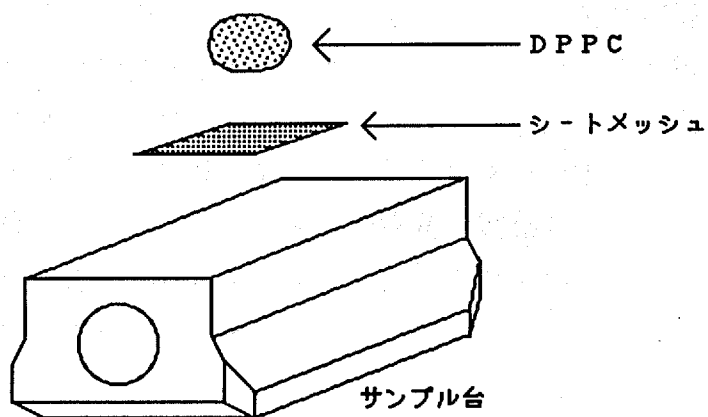


図 2 - 8. レプリカ作製用サンプル台

2-3. フリーズフラクチャー電子顕微鏡観察法

レプリカの作製は広島大学医学部解剖学第2教室（片岡研究室）に設置されている日本電子製の凍結試料作製装置（Freeze - Etching - Equipment）JFD-7000を使用した。

試料の各相の状態を観察するために異なる温度でレプリカを作製した。試料のレプリカ作製は、まずX線実験と同様に試料を作製し、それをレプリカ装置用のサンプル台（図2-8）に乗せる。その際、5mm×5mmに切ったシートメッシュをグリセリンに浸し、それをサンプル台に乗せ、その上に試料を乗せるようにする。これは、グリセリンには接着作用があり、後述の切断の際に試料がサンプル台から離れるのを防ぐためである。このサンプル台ごと温度調節用炉に乗せ、必要な温度制御を行い、目的の温度に達した後5分間その温度に保ち、その後試料を設定温度と同じ状態で見るとするために液体窒素で急速に凍結させる。なお温度調節炉の温度制御は回折実験の際と同様に温水を循環させて行った。凍結させた試料は温度が上がらないうちに素早くレプリカ装置に挿入し、液体窒素温度に冷やしたナイフを当て試料を切断する。なおエッチング装置のサンプル台をセットする部分はあらかじめ液体窒素温度まで冷やしている。次に切断面に対し斜め45度の方向から白金-カーボン蒸着し、さらにレプリカ膜の補強のため切断面に対し上方90度の方向からカーボン蒸着する。蒸着が終わったらサンプルをエッチング装置から出し、暫時室温中に放置し、試料温度を上げサンプル台から離す。次にきれいなレプリカを得るためにシートメッシュごとエタノールに入れて試料を溶かし出す。48時間後には試料は全て溶け出し、その後にレプリカを電子顕微鏡用グリッドに乗せる。

このようにして得られたレプリカを電子顕微鏡で観察し写真を撮った。電子顕微鏡は、広島大学総合科学部重中研究室に設置されている、日本電子製透過型電子顕微鏡JEM-100Sを使用した。

第三章

結果

測定結果を、3-1. 中性子小角散乱, 3-2. X線小角散乱(実験室), 3-3. X線小角散乱(放射光), 3-4. 電子顕微鏡観察の順に以下に示す。そしてこれら測定結果のまとめを3-5. に行う。3-1. は、1. 温度履歴, 2. 時間変化に、3-2. は、(1) $P_{\beta'}$ (mst)相から $L_{\beta'}$ 相へ急冷した場合および(2) $P_{\beta'}$ 相から $L_{\beta'}$ 相へ急冷した場合の時間変化に、3-3. は、(1) 温度履歴, (2) リップル相, (3) 時分割測定 of 回折パターンにそれぞれ分かれている。

3-1. 中性子小角散乱測定の結果

3-1-1. 温度履歴 (21)

図3-1に回折パターンの温度変化を示す。縦軸は散乱断面積, 横軸は散乱ベクトル $Q (= 4\pi \sin\theta/\lambda)$ である。ここで 2θ は散乱角, λ は波長をあらわす。図の左側が室温 (26.2°C) から主転移点以上までの加熱過程, 右側が主転移点以上から室温までの冷却過程をあらわしている。この図によれば、DPPC- D_2O 系の温度変化について次の三つの特徴がある。

第一に主転移点 (41°C) の上下で回折パターンに大きな違いがある。主転移点以上では繰り返し周期 d (脂質二重層+水層, ラメラ構造の基本単位) に対応する一次の回折ピークが主転移点以下に比べて著しく大きい。

第二に主転移点以下のリップル相の温度領域に、加熱過程と冷却過程の散乱パターンに大きな相違がある。加熱過程では $Q = 0.08 \text{ \AA}^{-1}$ 付近に繰り返し周期に対応する回折ピークが存在するが、冷却過程ではそのような回折ピークは見あたらず、その代わりに $Q = 0.03 - 0.08 \text{ \AA}^{-1}$ の領域に散乱強度の大きな“山”が見出された。即ち、加熱過程と冷却過程の間に履歴現象が見出された。

第三に冷却過程において、前転移点以下に温度を下げて、散乱強度の大きな“山”が存在し、繰り返し周期に対応する回折ピークは現れなかった。しかし、その温度のまま放置し、数時間後に再び測定すると回折ピークが出現

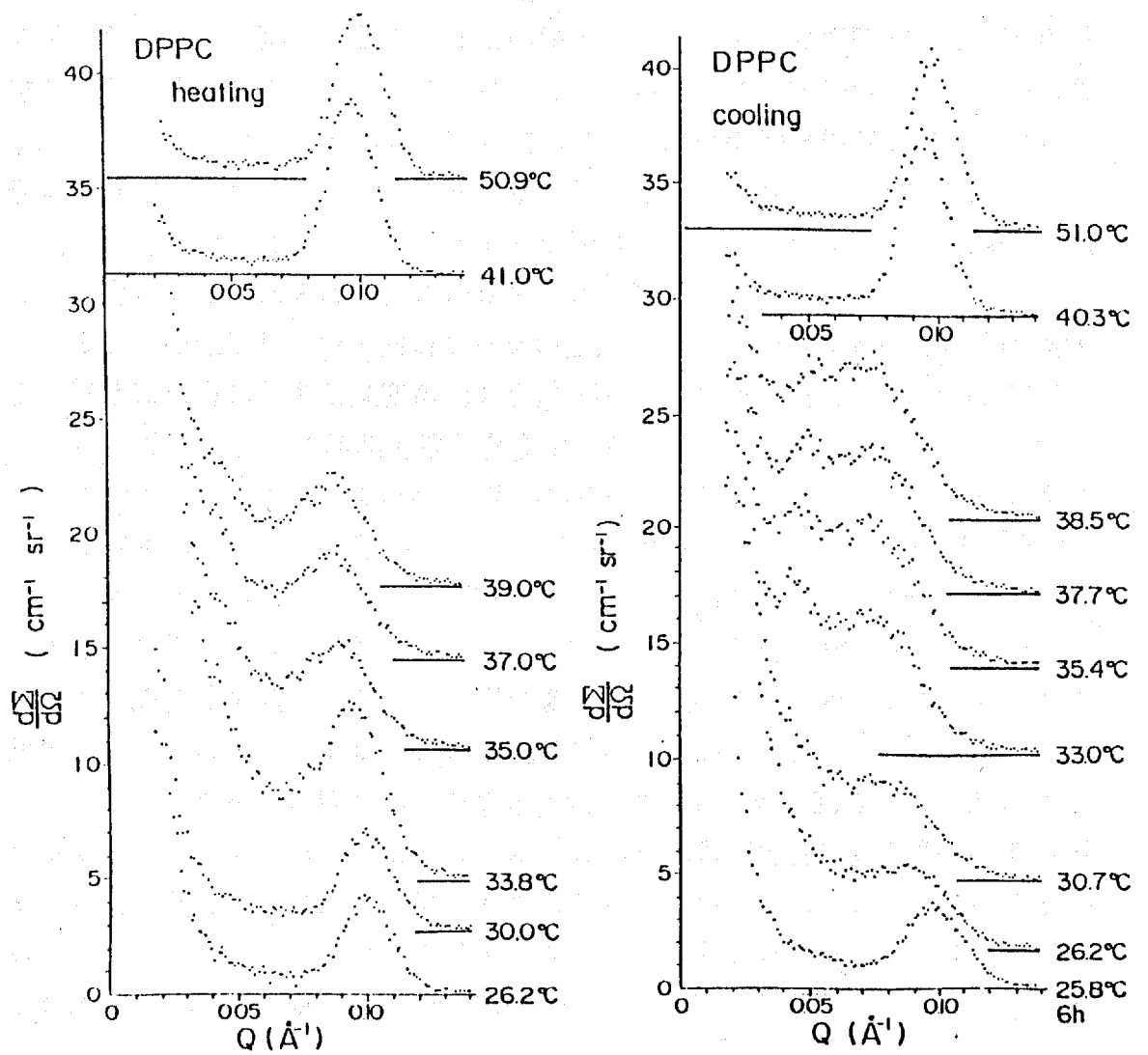


図3-1. 中性子小角散乱法による、DPPC-水系の散乱パターンの温度変化 (武田ら (21) より)

し、加熱過程の時と同様の回折パターンを示した(図3-1右最下端)。

このような温度サイクルを三回繰り返したが、いずれも上記のような三つの特徴が現れた。

3-1-2. 時間変化

3-1-1節の第三の特徴に注目して主転移点以上から、まずリップル相の出現する温度領域に冷却し、次にリップル相から前転移点以下の様々な温度へ急冷して散乱パターンの時間変化を測定した。急冷の方法は2-2-1節で記したように、試料容器を36℃の温水中につけ10分程度放置し、その後急冷する目標温度の水中につけて急冷した。約1分後に試料容器を水中から取り出して、あらかじめ目標温度に設定しておいた温度調節用容器に取り付けて測定を行った。図3-2は、36℃から約25℃へ急冷した後の散乱パターンの変化をあらわしている。縦軸、横軸は図3-1と同じである。この図によれば、温度によってあらわれ方に差があるが、時間とともに回折ピークが成長している。この成長している回折ピークの散乱ベクトル Q の位置は L_{β}' 相の繰り返し周期に相当し、また温度領域も L_{β}' 相の温度領域であることから、図3-2は L_{β}' 相の成長する緩和過程が存在することを示している。

またリップル相および L_{α} 相の出現する温度領域においても、 L_{β}' 相からリップル相(24.7℃→39.0℃)(図3-3)、リップル相から L_{α} 相(38.0℃→45.6℃)(図3-4)、 L_{α} 相からリップル相(45.0℃→38.4℃)(図3-5)のように温度変化をさせて散乱パターンの時間変化を調べてみたが、温度変化後の膜間の繰り返し周期に対応する回折ピーク($Q=0.1\text{\AA}^{-1}$)の変化は見られなかった。

リップル相から低温相への緩和時間を求めるため、図3-2において $Q=0.03, 0.06, 0.09\text{\AA}^{-1}$ における散乱断面積の対数の時間変化をとった。図3-6は、その様子をあらわしたものである。この図に示された $Q=0.03\text{\AA}^{-1}$ および 0.06\AA^{-1} における直線の傾きから、次の式を用いて温度 T における緩和時間 $\tau(T)$ を求めた。

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau(T)) + I_f, \quad \dots \quad (3.1)$$

ここで $I(t)$, I_0 , I_f はそれぞれ時間 t , 0における散乱断面積および一定値

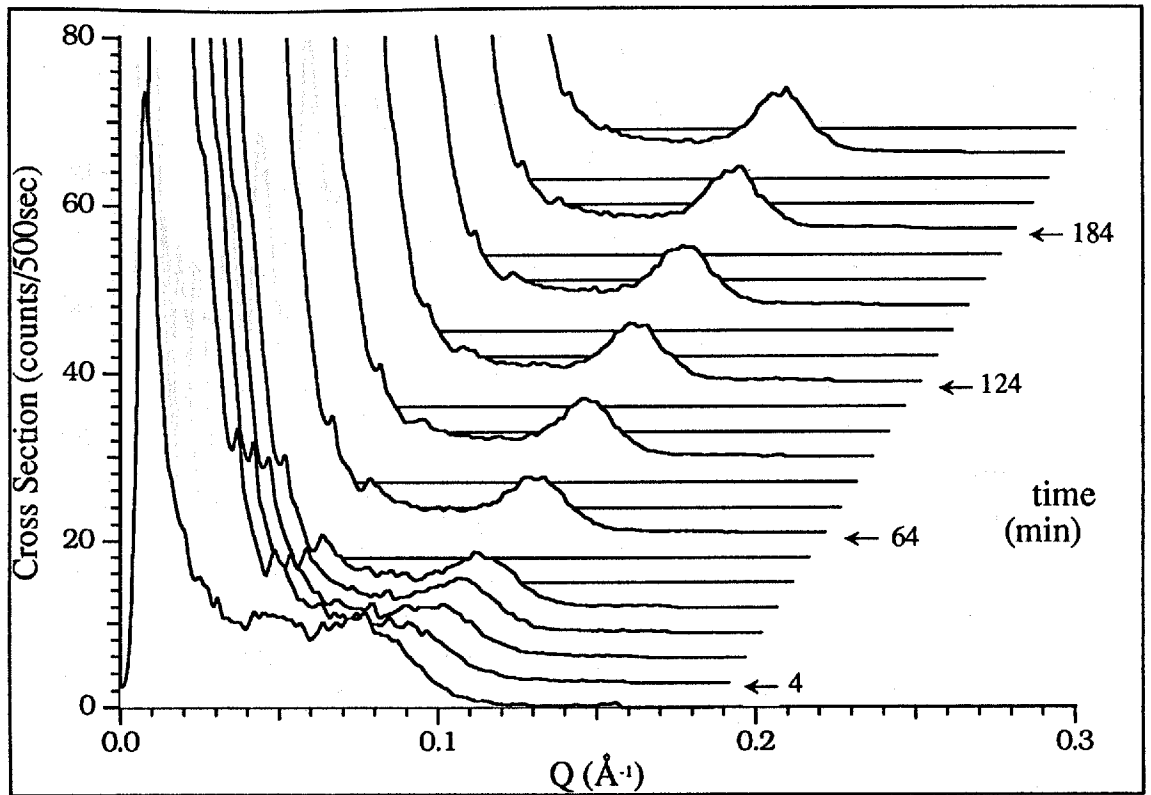


図3-2. $P_{\beta'}$ (mst)相 (36.0°C) から $L_{\beta'}$ 相 (24.6°C) へ急冷した時の中性子小角散乱パターンの時間変化

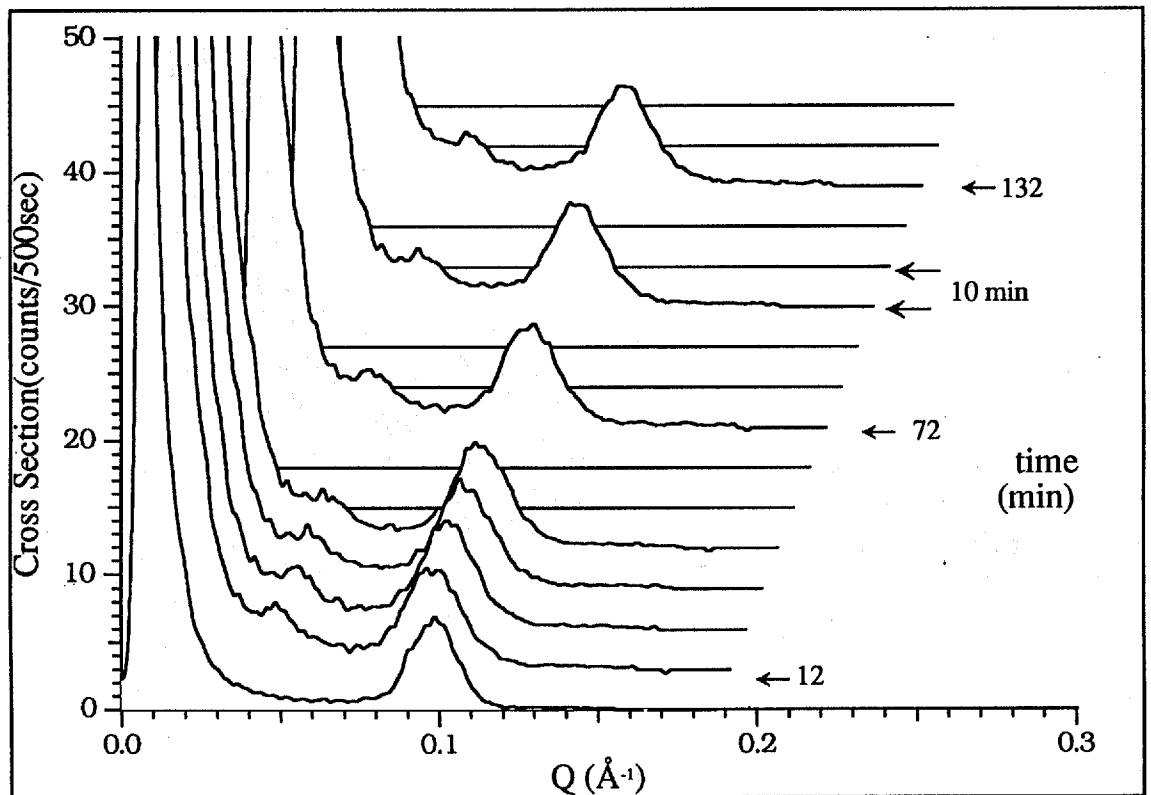


図3-3. $L_{\beta'}$ 相 (24.7°C) から $P_{\beta'}$ 相 (39.0°C) へ昇温した時の中性子小角散乱パターンの時間変化

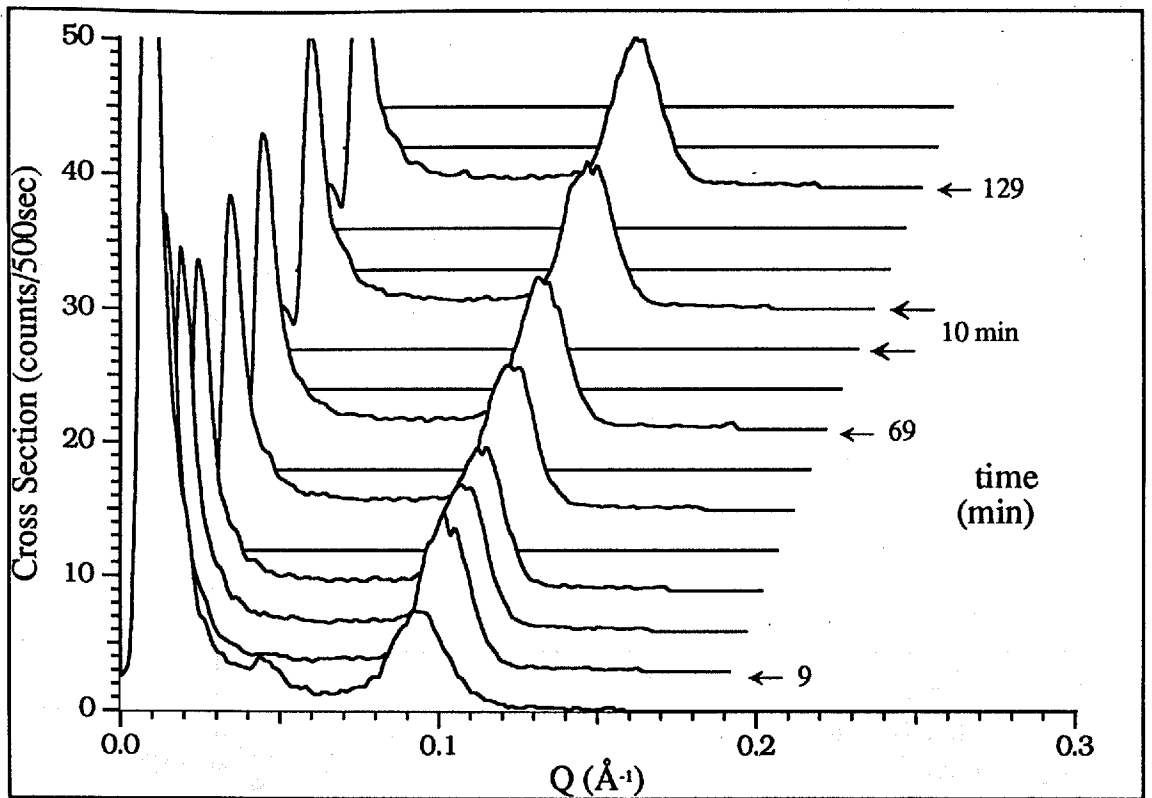


図3-4. $P_{\beta'}$ 相 (38.0°C) から L_{α} 相 (45.6°C) へ
昇温した時の中性子小角散乱パターンの時間変化

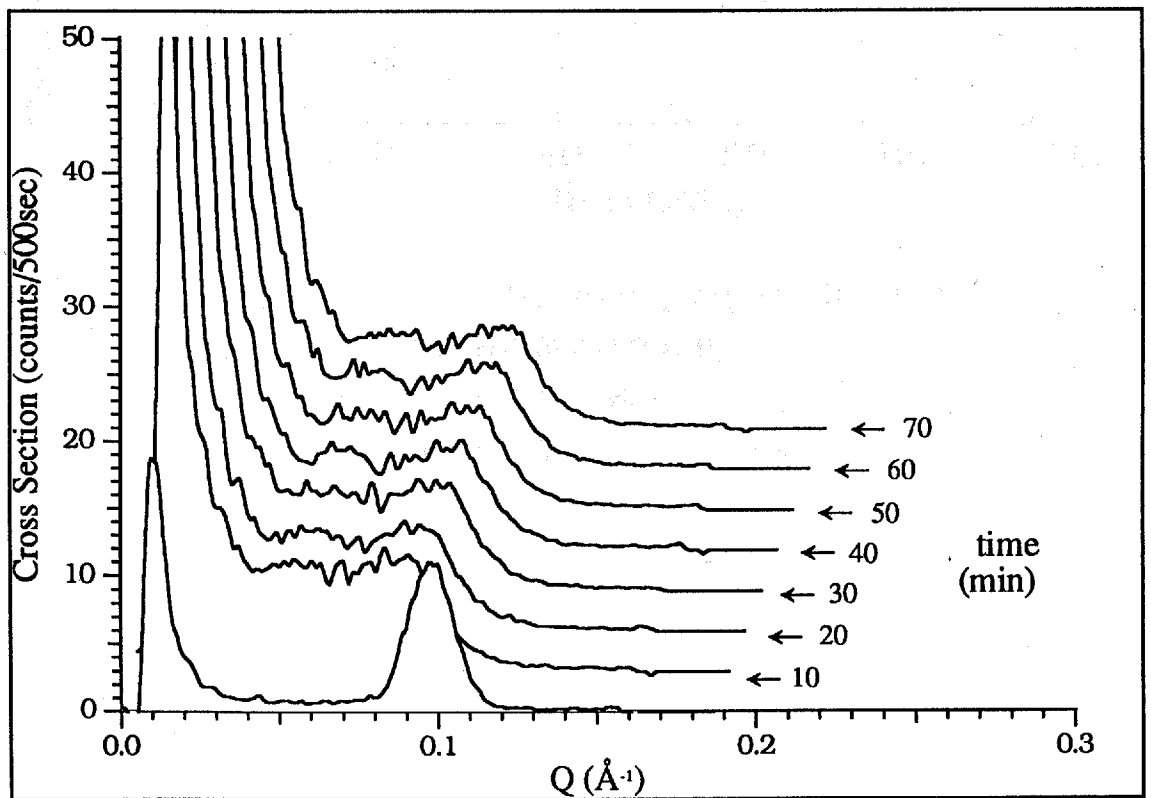


図3-5. L_{α} 相 (45.0°C) から $P_{\beta'}$ (mst)相 (38.4°C) へ
急冷した時の中性子小角散乱パターンの時間変化

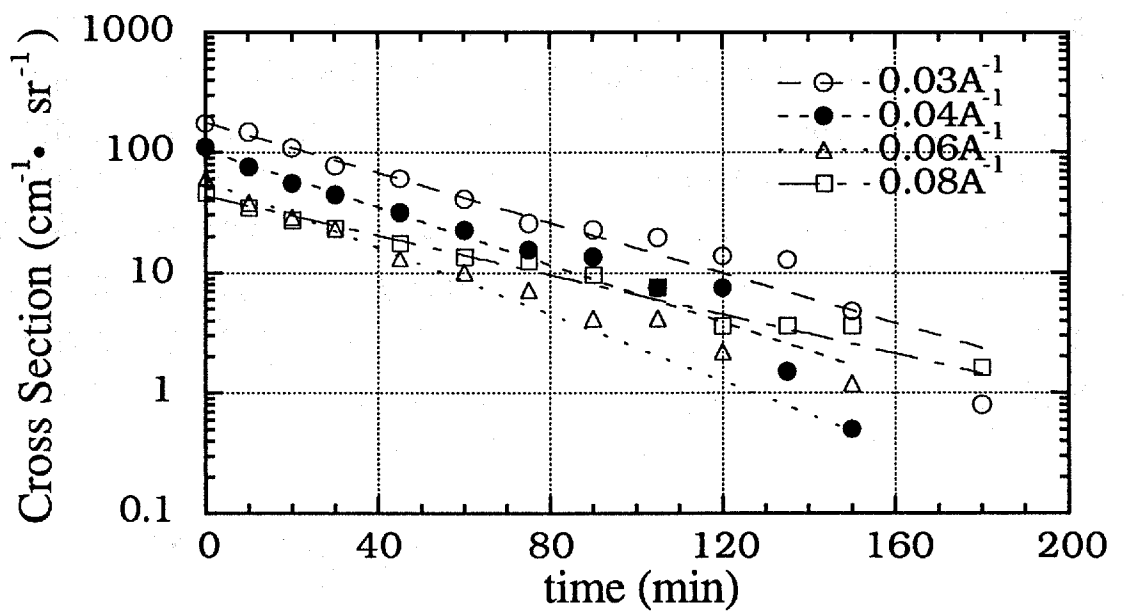


図3-6. 図3-2において、特定の Q 値ごとの
散乱断面積の時間変化

\circ : 0.03 \AA^{-1} , \bullet : 0.04 \AA^{-1} ,
 \triangle : 0.06 \AA^{-1} , \square : 0.08 \AA^{-1}

に飽和した時の散乱断面積， $\tau(T)$ は緩和時間である。このようにして、測定した様々な温度についての緩和過程からその緩和時間を求め、その緩和時間を温度の関数としてプロットしたのが図3-7である。矢印は前転移点をあらわす。これによれば、 L_{β}' 相の成長は温度が下がるにつれ遅くなる。一方、前転移点に近づくとつれ、 L_{β}' 相の成長の緩和時間は発散する傾向を示している。この結果、 $\tau(T)$ は25℃付近に極小をもつU字型曲線となっている。

3-2. X線小角散乱 (実験室) の結果

3-2-1. 時間変化 (P_{β}' (mst)相 $\rightarrow L_{\beta}'$ 相) (30), (31)

図3-8に P_{β}' (mst)相から L_{β}' 相へ急冷した時の、X線小角散乱法による散乱パターンの時間変化を示す。温度は試料容器を主転移点以上の43℃から急冷して38℃にし、ここで約10分放置する。その後38℃から15℃に、始めの約15秒間は4.5℃/分の割合で、次の約80秒間は平均して約4℃/分の割合で急冷し、その後は0.5℃/分の割合で緩やかに下がり、約3分で15℃に到達した後一定に保った。時間と共に回折ピークが成長している。同様の測定を急冷する目標温度を変えて行った。それらの結果より緩和時間を求めることを試みた。そのために図3-8に示されてあるような各時間毎の散乱パターンの回折ピーク付近の強度について、ローレンツ関数

$$I(Q) = I_0 + \frac{I_1}{(Q - Q_1)^2 + \gamma^2} \quad , \quad \dots \quad (3.2)$$

により、 I_0 、 I_1 、 Q_1 、 γ をパラメーターとして最小自乗法を用いて (図3-9)、その結果得られた回折ピークの最適曲線から回折ピーク強度 ($I_0 + I_1/\gamma^2$) を求めた。こうして得られた一次の回折ピーク強度を時間の関数としてプロットした。図3-10はその結果をまとめたものである。縦軸は一次の回折ピーク強度、横軸は時間である。ある一定の時間で回折ピーク強度が飽和している。この飽和した回折ピーク強度 I_f と時間の原点 t_0 における回折ピーク強度 I_0 、それに時間 t の回折ピーク強度 $I(t)$ を用いて、次の関係式より、中性子の場合同様に温度 T における緩和時間 $\tau(T)$ を計算する。

$$I(t) = I_0 + I_f \{1 - \exp(-(t - t_0)/\tau(T))\} \quad , \quad \dots \quad (3.3)$$

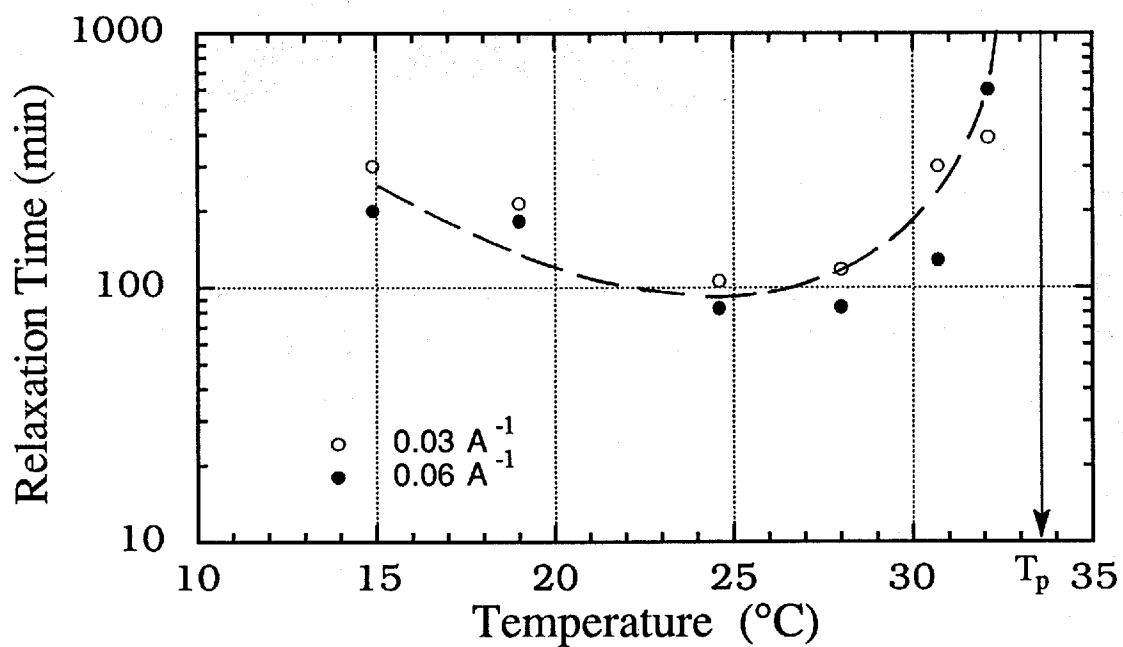


図3-7. 中性子散乱断面積の時間変化より求めた緩和時間の温度依存性

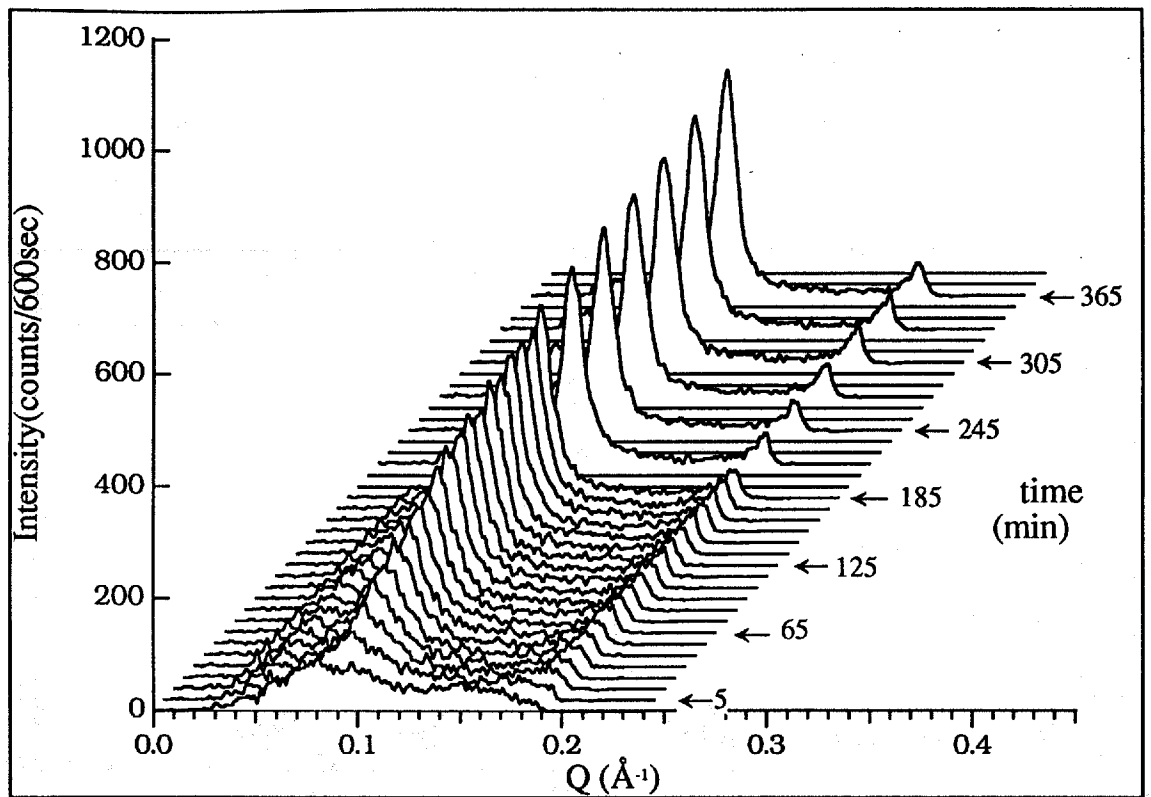


図3-8. X線小角散乱法(実験室)による $P_{\beta'}$ (mst)相(37.7℃)から $L_{\beta'}$ 相(15.0℃)へ急冷した際の散乱パターンの時間変化

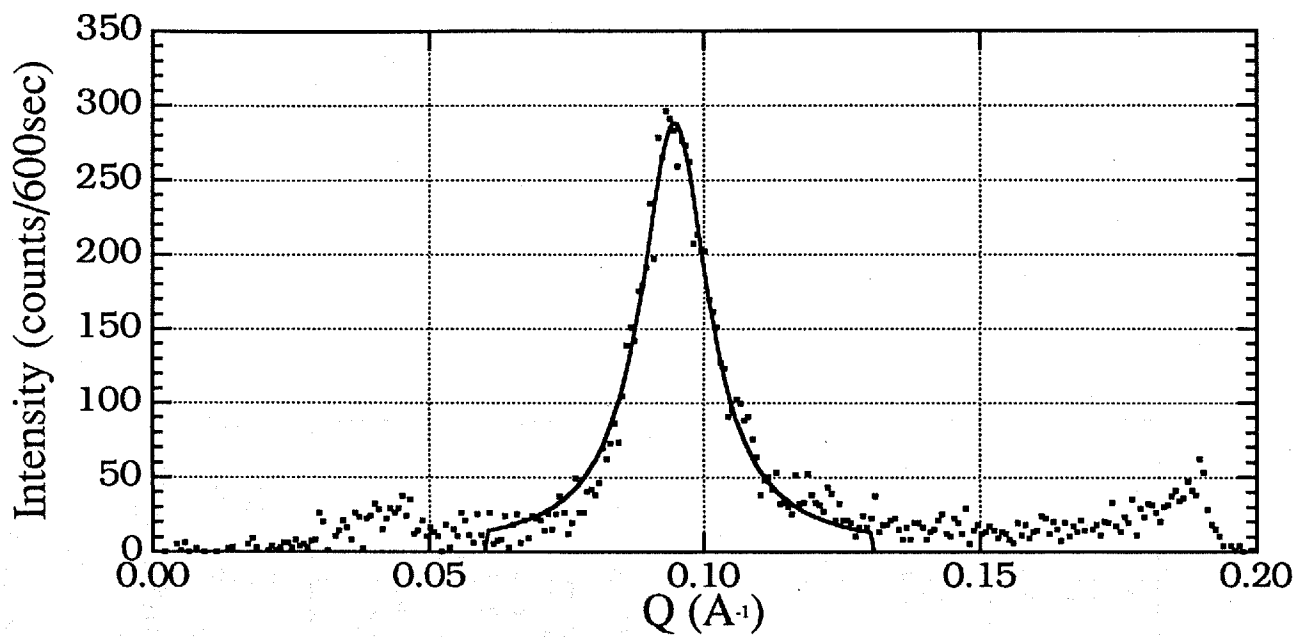


図3-9. ローレンツ関数によるX線小角散乱
パターンの最適曲線

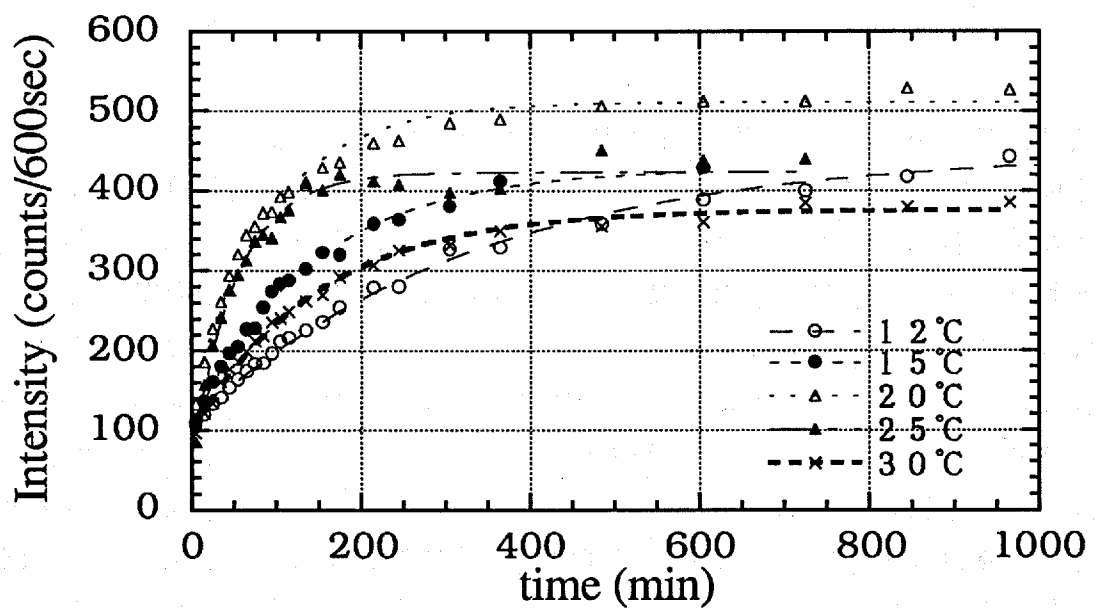


図3-10. X線小角散乱法(実験室)による $P_{\beta'}$ (mst)相から $L_{\beta'}$ 相の温度領域へ急冷した際の各温度別の一次回折ピーク強度の時間変化

○: 12°C, ●: 15°C, △: 20°C, ▲: 25°C, ×: 30°C

図3-10の各破線は、 I_f , t_0 , I_0 , $I(t)$ および緩和時間 $\tau(T)$ をパラメーターとして(3.3)式を用いた最小自乗法により得られた最適曲線である。このようにして各温度毎の緩和時間をもとめて、その関係をプロットしたのが図3-11である。これによれば緩和時間は冷却過程の目標温度が約25~26℃において最小値をとり、これよりも目標温度が降下しても、また反対に上昇して前転移点に近付いても大きくなり、25℃付近で極小値をもつU字型曲線となり、図3-7における中性子散乱の場合と類似した結果が得られた。ただし、中性子散乱の場合は散乱強度が減少する(3.1)式の過程であるのに対して、X線の場合は散乱強度が増大する(3.3)式の過程であることに注意する必要がある。

3-2-2. 時間変化 ($P_{\beta'}$ 相 \rightarrow $L_{\beta'}$ 相)

3-2-1. で行ったのと同様の方法で $P_{\beta'}$ 相から $L_{\beta'}$ 相へ急冷したときのX線小角散乱測定およびその解析を行い、各温度における緩和時間および緩和時間の温度依存性を求めた。図3-12が15℃におけるX線小角散乱パターンの時間変化をあらわしたものである。急冷の割合は始めの約15秒が42.5℃/分、次の40秒が約6.3℃/分である。図3-13は15℃における一次の回折ピーク強度を時間の関数としてプロットしたものである。比較のため($P_{\beta'}$ (mst)相 \rightarrow $L_{\beta'}$ 相)の場合の結果、則ち図3-10の15℃の結果を載せてある。図3-14は種々の温度へ急冷した場合の各温度毎の一次の回折ピーク強度の時間変化の結果を長い時間に対してプロットしたもので、図3-14(a)は全体の傾向を、図3-14(b)は(a)の始めの100分間を拡大したものである。これによれば($P_{\beta'}$ 相 \rightarrow $L_{\beta'}$ 相)の方が

($P_{\beta'}$ (mst)相 \rightarrow $L_{\beta'}$ 相)の場合よりもはるかに早く一定値に達している。これは15℃における($P_{\beta'}$ 相 \rightarrow $L_{\beta'}$ 相)の緩和時間が、同じ温度における

($P_{\beta'}$ (mst)相 \rightarrow $L_{\beta'}$ 相)の緩和時間よりも著しく小さいことを意味し、両者の構造の緩和機構が全く別のものであることを示唆している。図3-14の各破線は(3.3)式を用いた最小自乗法により得られた最適曲線である。ただし25℃以下の測定では始めのデータ点一点のみが変化の途中であり、この始めの一点がそれぞれの温度の最適曲線を求める際に他のデータ点よりも大きな比重を占めている。最適曲線で求めた緩和時間はその上限を与えると考えられる。図3-14で得られた最適曲線から緩和時間を求めた。その緩和時間の温度依存

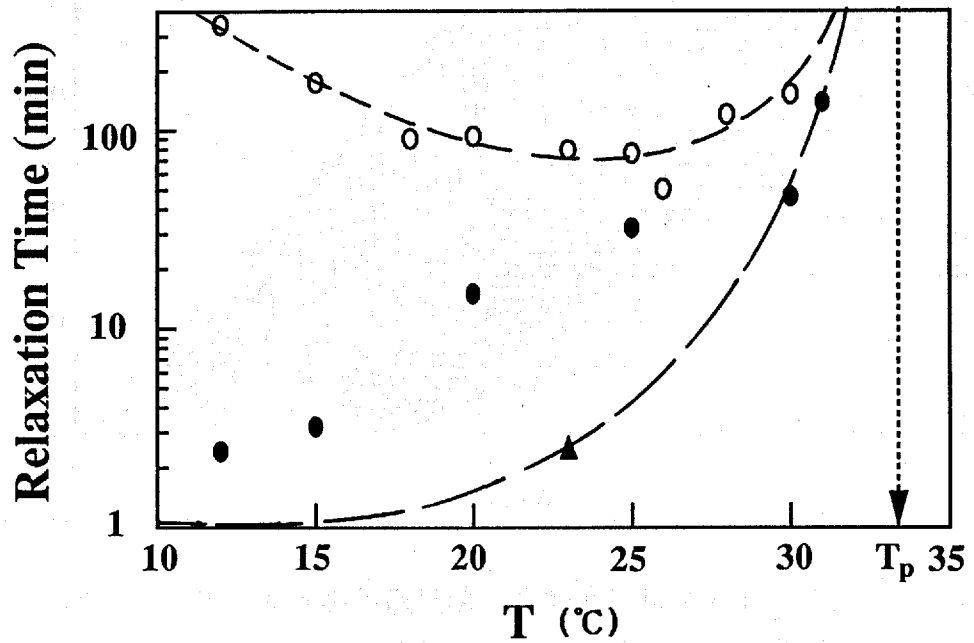


図3-11. X線一次回折ピーク強度の時間変化より求めた緩和時間の温度依存性

- : P_{β'} (mst)相 → L_{β'} 相 (実験室)
- : P_{β'} 相 → L_{β'} 相 (実験室)
- ▲ : P_{β'} 相 → L_{β'} 相 (放射光)

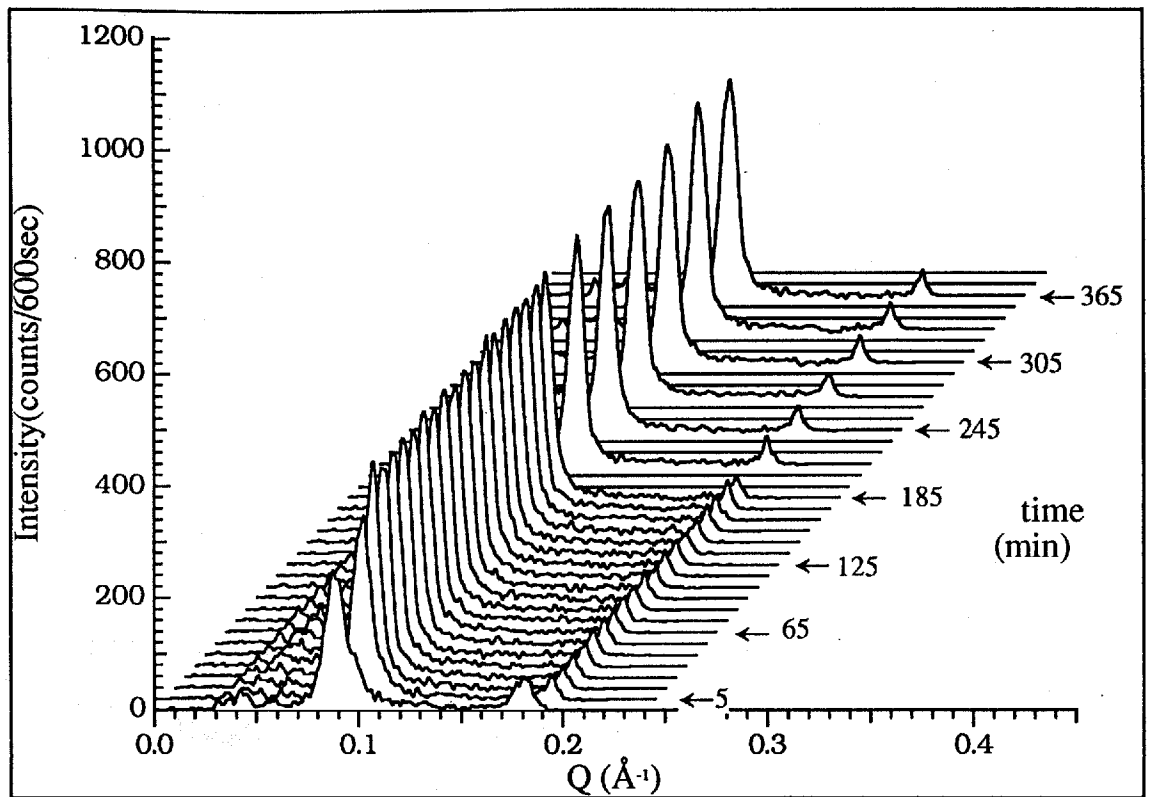


図3-12. X線小角散乱法(実験室)による $P_{\beta'}$ 相(37.7℃)から $L_{\beta'}$ 相(15.0℃)へ急冷した際の散乱パターンの時間変化

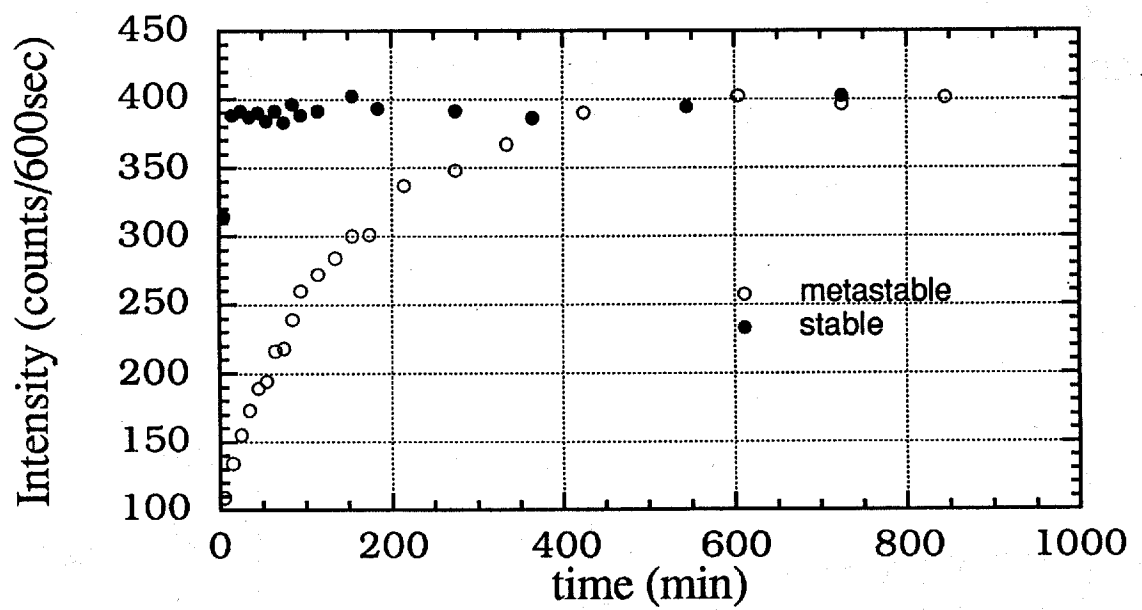
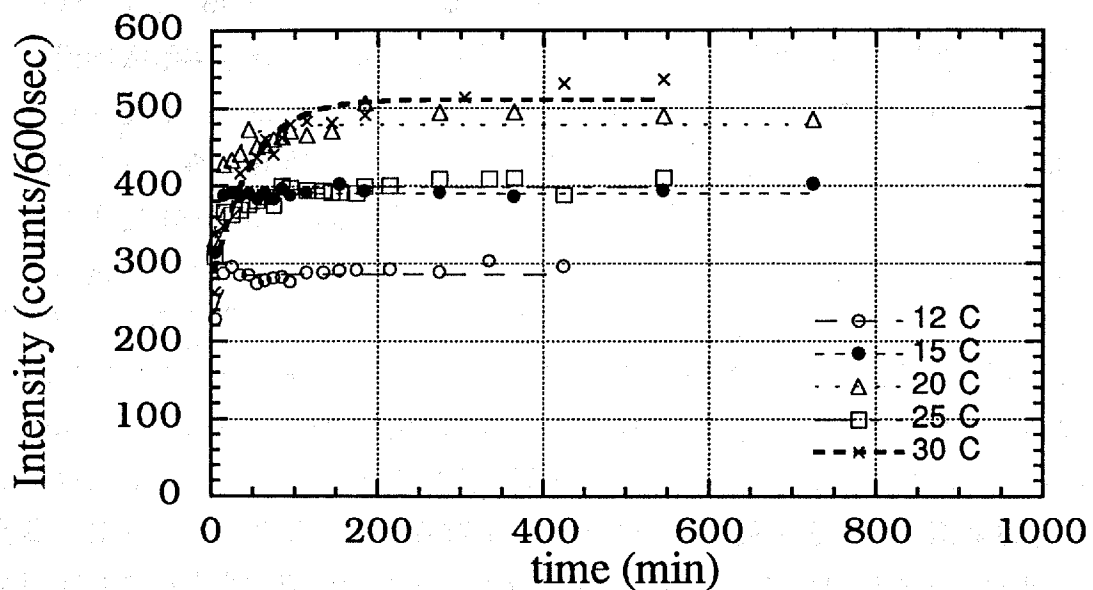
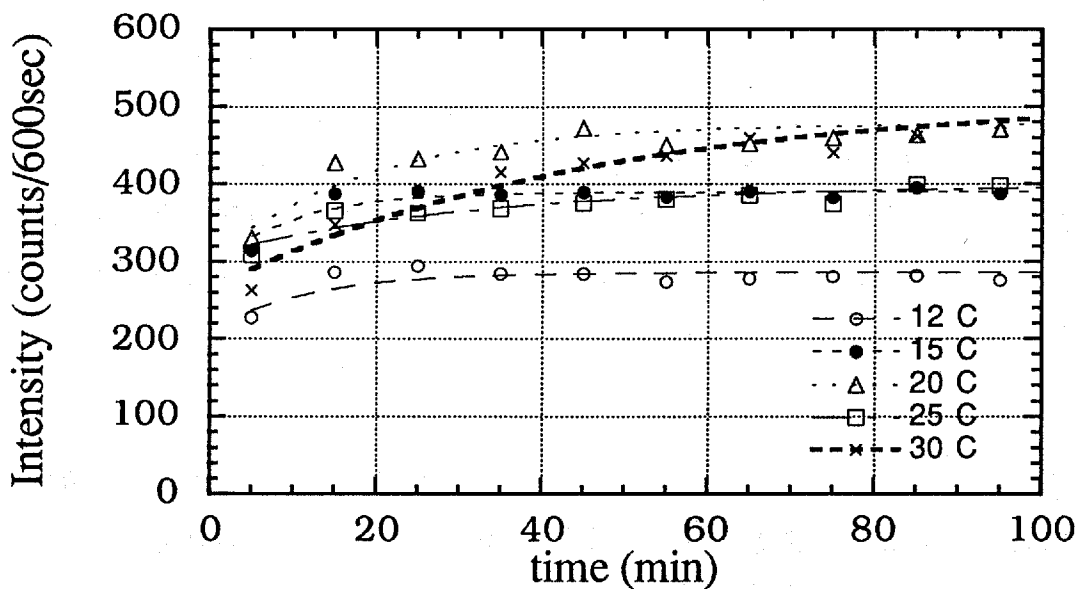


図3-13. X線小角散乱法 (実験室) による $P_{\beta'}$ 相
 (37.7°C) から $L_{\beta'}$ 相 (15.0°C)
 へ急冷した際の一次回折ピーク強度の時間変化
 ● : $P_{\beta'}$ 相 \rightarrow $L_{\beta'}$ 相, ○ : $P_{\beta'}$ (mst)相 \rightarrow $L_{\beta'}$ 相



(a) 0~1000min



(b) 0~100min

図3-14. X線小角散乱法(実験室)による $P_{\beta'}$ 相から $L_{\beta'}$ 相の温度領域へ急冷した際の各温度別の一次回折ピーク強度の時間変化

○: 12°C, ●: 15°C, △: 20°C, □: 25°C, ×: 30°C

性を図3-11に合わせて示す。図3-11によれば、まず ($P_{\beta'}$ 相 $\rightarrow L_{\beta'}$ 相) の場合の緩和時間は ($P_{\beta'}$ (mst)相 $\rightarrow L_{\beta'}$ 相) の場合に比べて著しく小さい。また ($P_{\beta'}$ 相 $\rightarrow L_{\beta'}$ 相) の場合は低温になるほど緩和時間は単調に小さくなる傾向が示唆されている。即ち約25℃以下では緩和時間の温度依存性について ($P_{\beta'}$ 相 $\rightarrow L_{\beta'}$ 相) および ($P_{\beta'}$ (mst)相 $\rightarrow L_{\beta'}$ 相) の場合に著しい差異が見られる。前転移点に近い30℃前後の温度領域では ($P_{\beta'}$ 相 $\rightarrow L_{\beta'}$ 相) および ($P_{\beta'}$ (mst)相 $\rightarrow L_{\beta'}$ 相) どちらの場合も前転移点に近づくにつれて緩和時間は長くなる傾向を示しているが、約25℃以下では緩和時間の温度依存性について両者の場合に著しい差異が見られる。

図中の23℃の▲で示した値は放射光による測定結果である。この結果は緩和過程の初期約9分間を8秒間隔(7秒測定+1秒データセーブ)で測定した結果に(3.3)式を用いた最適曲線(図3-15)から緩和時間を求めたものである。20℃や25℃における緩和時間とはかなり異なるが緩和過程初期を詳細に調べている点で他のデータよりも信頼性がある。この放射光を用いた23℃の結果より、($P_{\beta'}$ 相 $\rightarrow L_{\beta'}$ 相)の場合の緩和時間は、23℃以外の温度においても、実験室における測定結果から得られた値よりもさらに著しく小さいことが示唆される。

3-3. X線小角散乱(放射光)測定の結果

3-3-1. 温度履歴

図3-16(a)および(b)に放射光によるDPPC-水系のそれぞれ加熱過程と冷却過程の回折パターンを示す。3-1節および3-2節の二つの方法と同様に加熱過程と冷却過程の間で履歴現象が現れている。

3-3-2. リップル相の回折パターン

図3-17にリップル相の回折パターン(38.0℃)を示す。(a)は加熱過程、すなわち $L_{\beta'}$ 相からの温度変化における安定な $P_{\beta'}$ 相の回折パターン、(b)は冷却過程、すなわち L_{α} 相から急冷した場合に現れる $P_{\beta'}$ (mst)相の回折パターンである。(a)と(b)の回折パターンは大きく食い違っている。なお、図中の括弧つきの数字は(a)の右上に示してあるリ

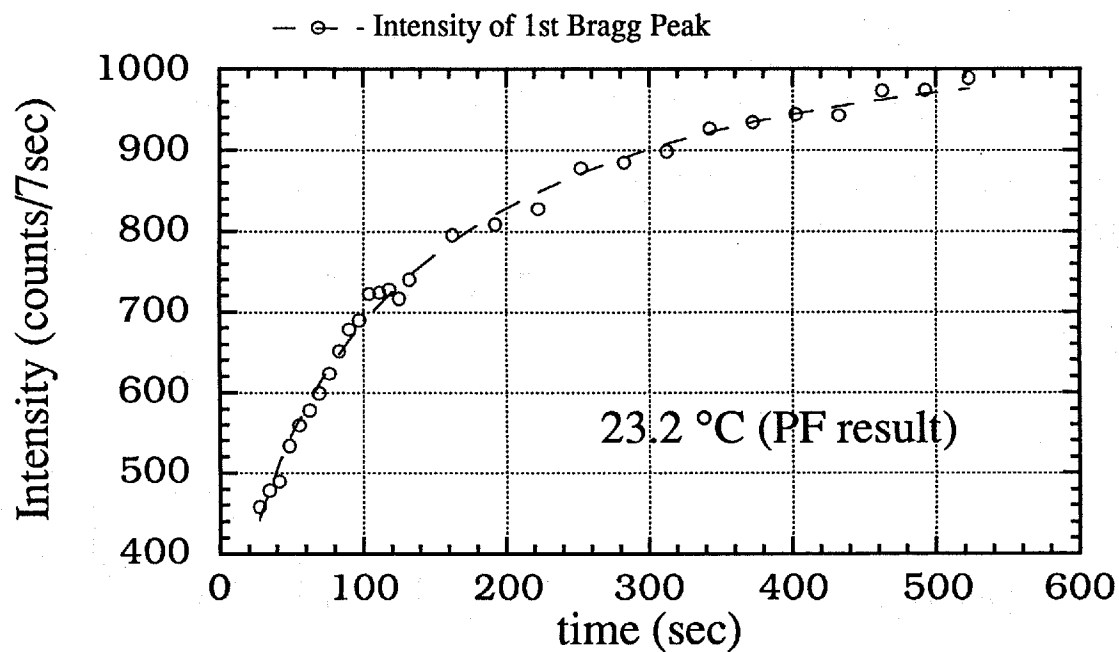


図3-15. X線小角散乱法 (放射光) による P_{β}' 相
 (37.7°C) から L_{β}' 相 (23.2°C)
 へ急冷した際の一次回折ピーク強度の時間変化

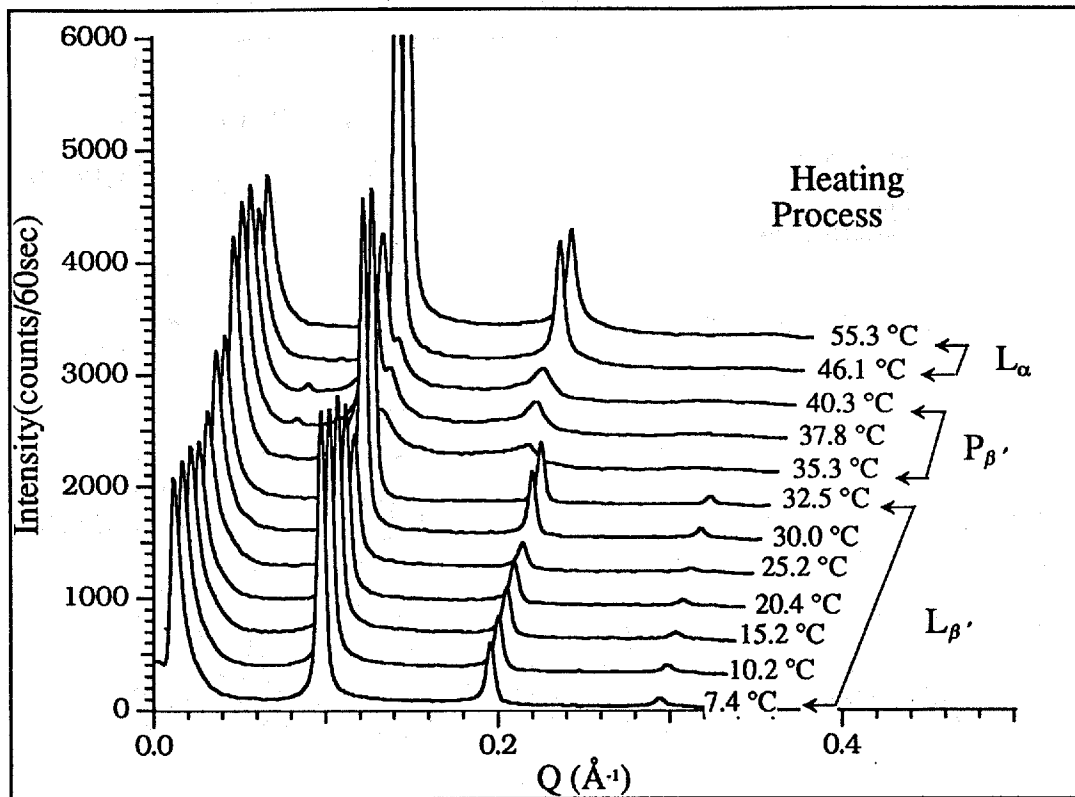


図3-16. (a) 加熱過程におけるX線小角散乱パターン(放射光)の温度変化(7.4°C~55.3°C)

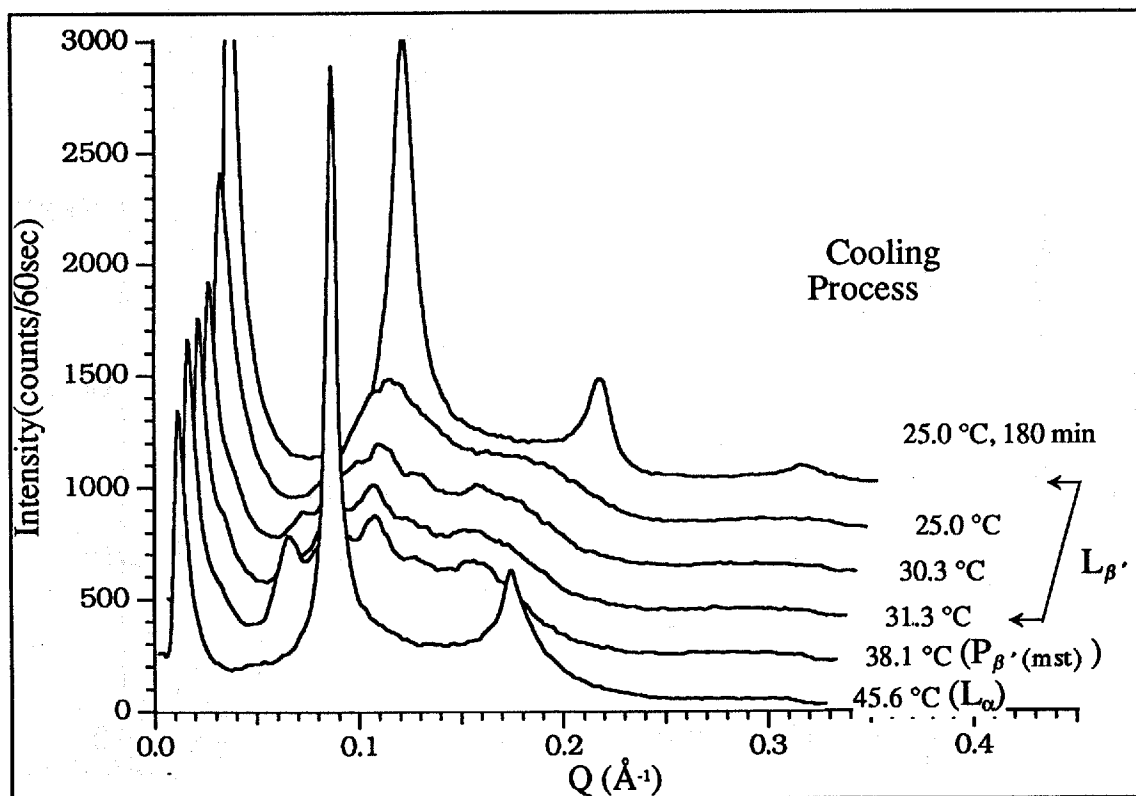
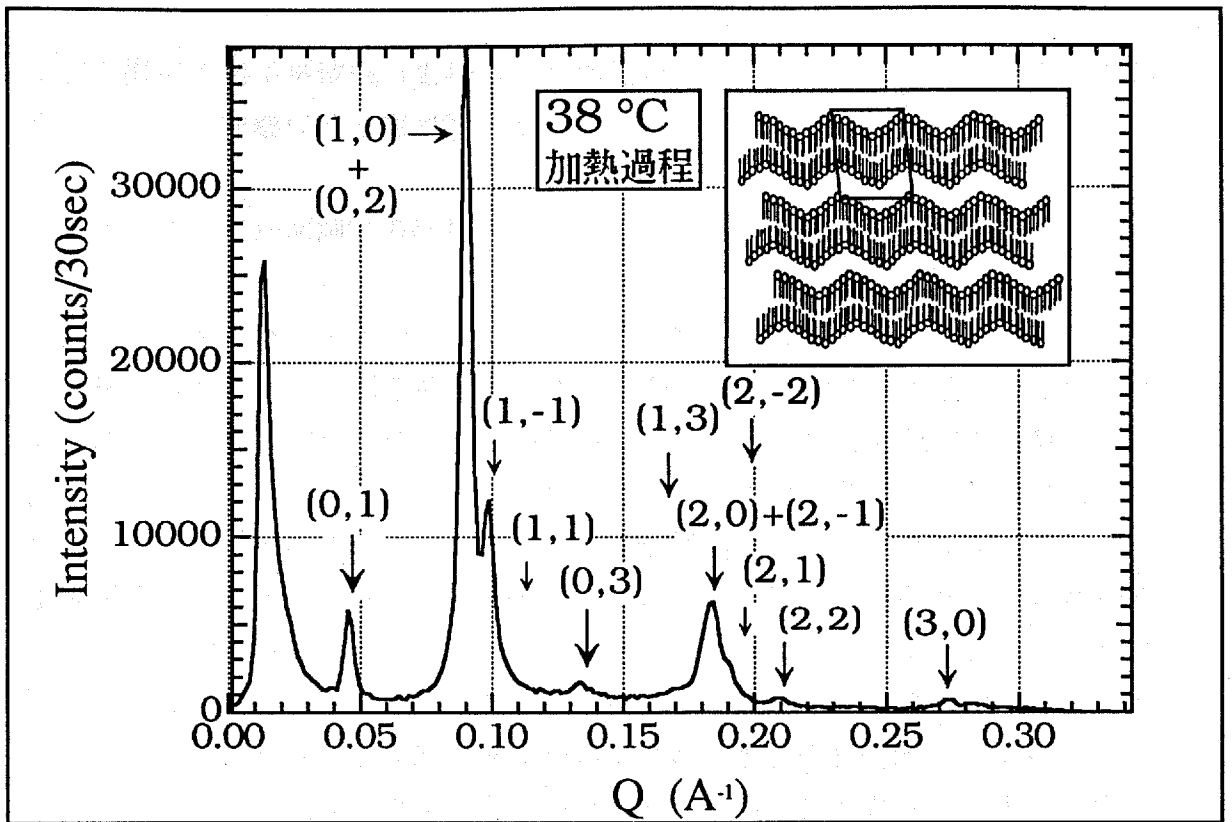
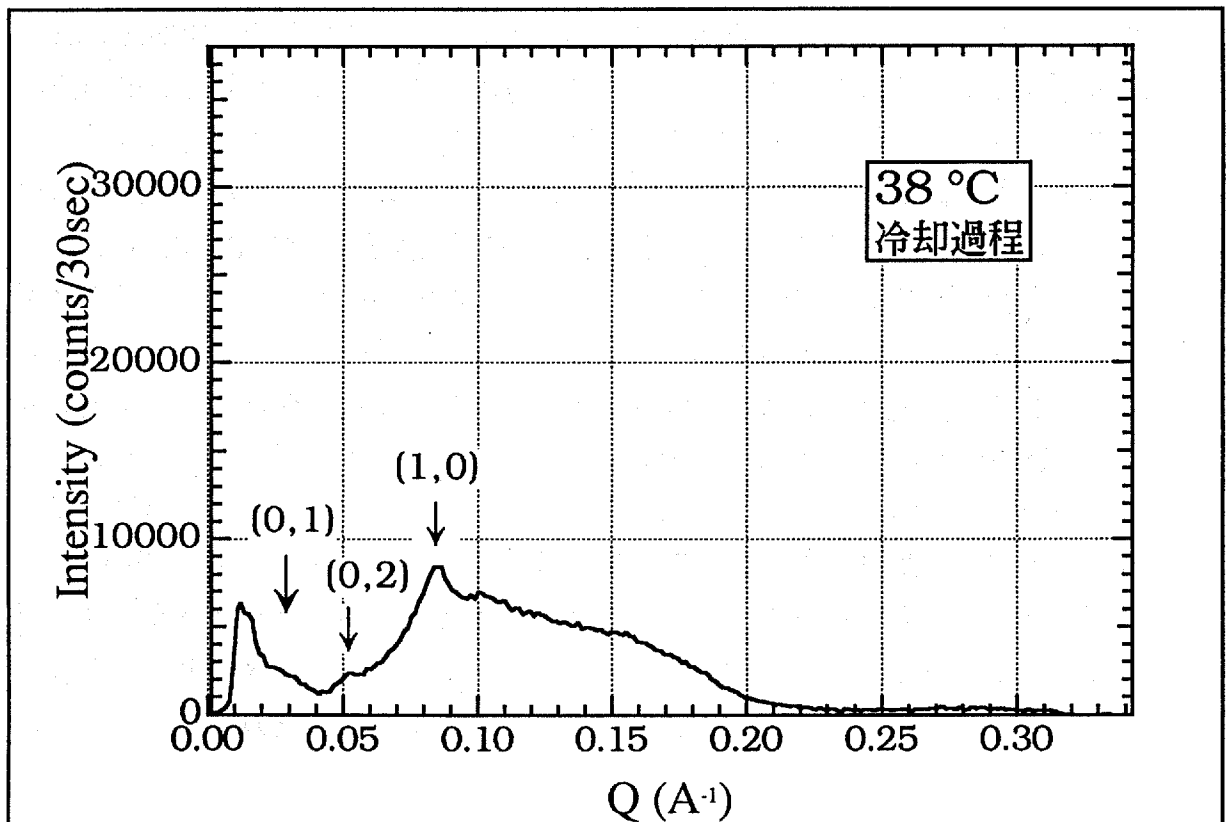


図3-16. (b) 冷却過程におけるX線小角散乱パターン(放射光)の温度変化(55.3°C~25.0°C)



(a) P_{β'} 相



(b) P_{β'} (mst)相

図3-17. リップル相におけるX線小角散乱パターン (放射光)

リップル構造の格子単位胞（太枠の平行四辺形で表示）によるブラッグ反射指数をあらわす。詳細は第4章で触れる。

3-3-3. 時分割測定の結果

長い緩和は3-1節および3-2節で調べた通りであるが、放射光によるX線小角散乱により引き続き短い緩和を測定した。図3-18~21は温度変化に伴う相間の初期の構造変化の様子を時分割測定により調べた結果である。図3-18および3-20はリップル相から L_{β}' 相への構造の時間変化を表わす時分割X線小角散乱パターンである。時分割幅は全て7秒である。図3-18が P_{β}' (mst)相から L_{β}' 相の場合に、図3-20が P_{β}' 相から L_{β}' 相の場合である。図3-19および3-21はそれぞれ図3-18および3-20の時分割散乱測定の初期（0~52秒）の散乱パターンのみを取り出して拡大した図である。これらによればリップル周期に対応する位置（図3-19, 3-21 (b) に矢印で表示）と、厳密に吟味すると膜の繰返し周期に対応する位置に変化が見られる。 P_{β}' 相から L_{β}' 相へおよび P_{β}' (mst)相から L_{β}' 相へのいずれの場合もそれぞれリップル周期に対応する $Q \sim 0.06$ および 0.04 \AA^{-1} の回折ピークが温度変化開始後12~20秒程度で消えている。これは温度変化開始後12~20秒程度で前転移点を通過するため、 L_{β}' 相の温度領域に達するとどちらの場合も速やかにリップルが消失することを表していると考えられる。一方、脂質膜の繰返し周期に対応する回折ピークの振舞いは両者間で大きく異なる。 P_{β}' 相から L_{β}' 相への場合では前転移点を通過するとすぐに脂質膜の繰返し周期に対応する $Q \sim 0.085 \text{ \AA}^{-1}$ の回折ピーク強度が減少し、膜の繰返し周期のかなり乱れた状態が出現する（図3-21 (a)）。そしてこれから $Q \sim 0.095 \text{ \AA}^{-1}$ に L_{β}' 相の繰返し周期に対応する回折ピークが成長し始め、時間とともに速やかに成長している（図3-20, 3-21 (a)）。これに対し P_{β}' (mst)相から L_{β}' 相への場合では繰返し周期に対応するシャープな回折ピークは存在せず、始めから繰返し周期の乱れた状態が出現している。そして前転移点通過直後の繰返し周期に対応する一次回折ピークの変化は乏しく、徐々に乱れた回折ピークの形が変わり始め、時間とともに比較的ゆっくりと $Q \sim 0.095 \text{ \AA}^{-1}$ に L_{β}' 相の繰返し周期に対応する回折ピークが成長している（図3-18, 3-19）。

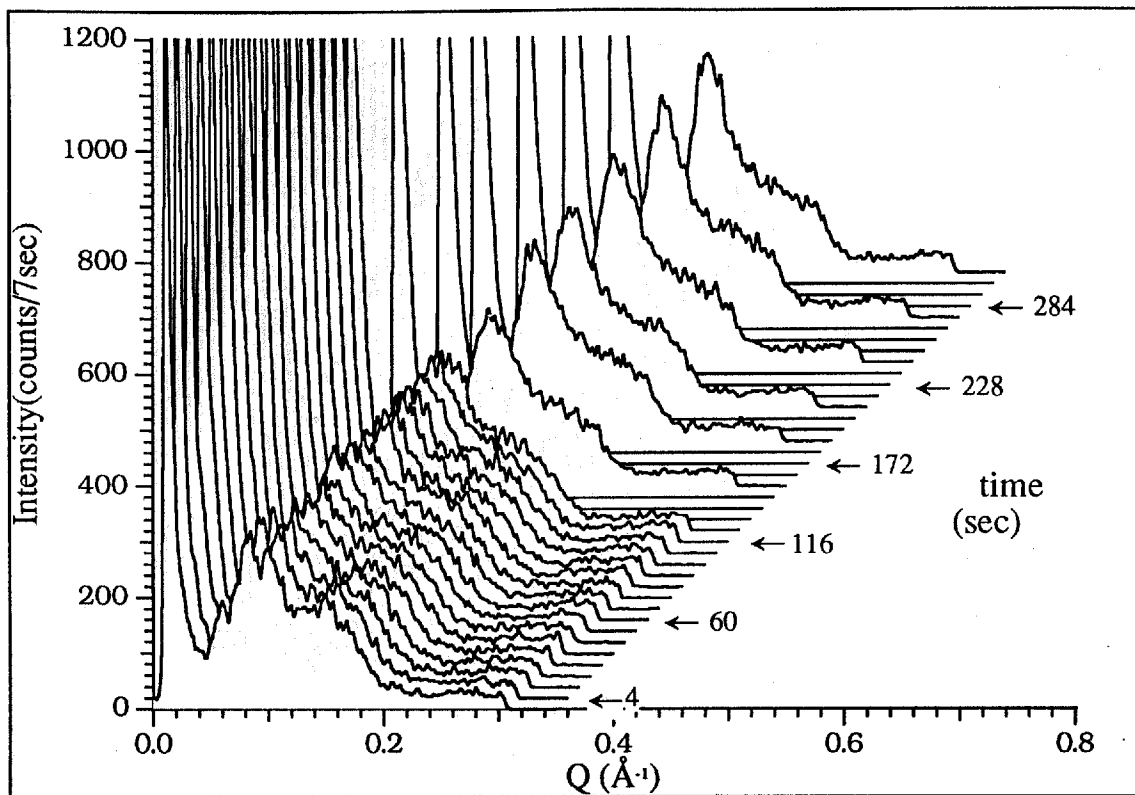


図3-18. $P_{\beta'}$ (mst)相 (37.7°C) から $L_{\beta'}$ 相 (24.6°C)
へ急冷した時の時分割X線小角散乱パターン (放射光)

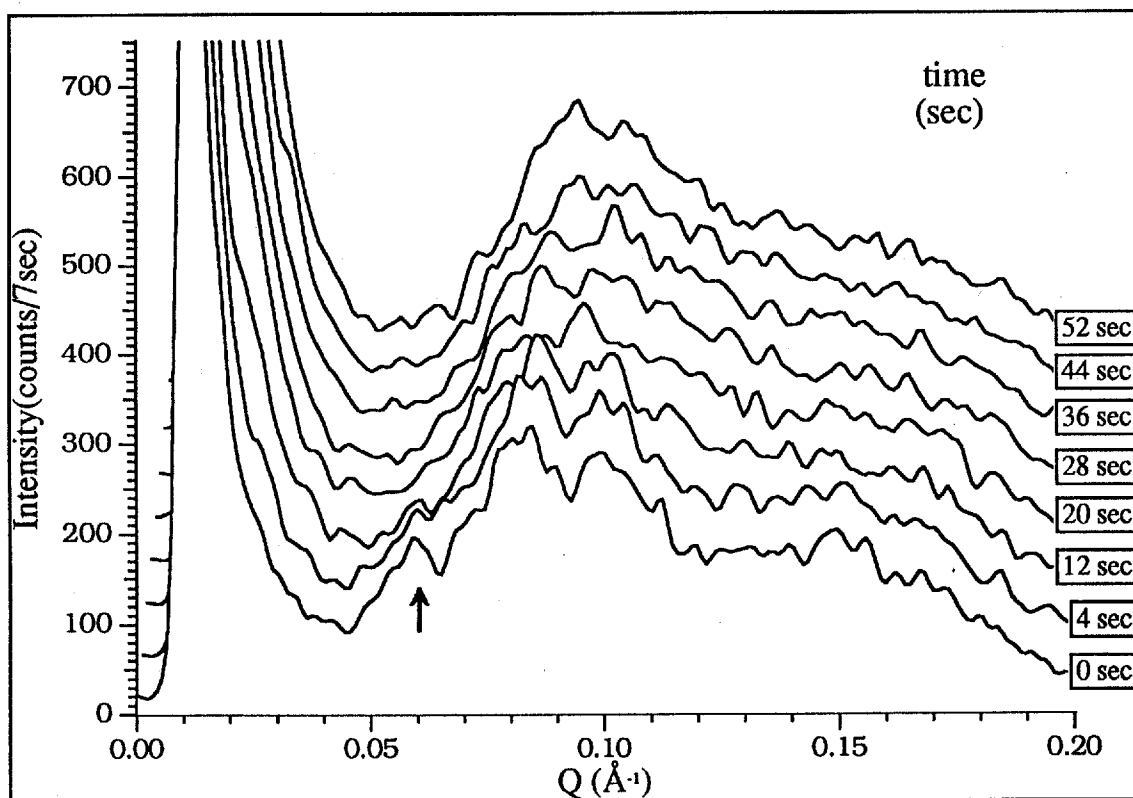


図3-19. 図3-18の時分割X線小角散乱測定結果における
初期 (0~52秒) のパターンの拡大。
矢印はリップル周期に対応する回折ピーク

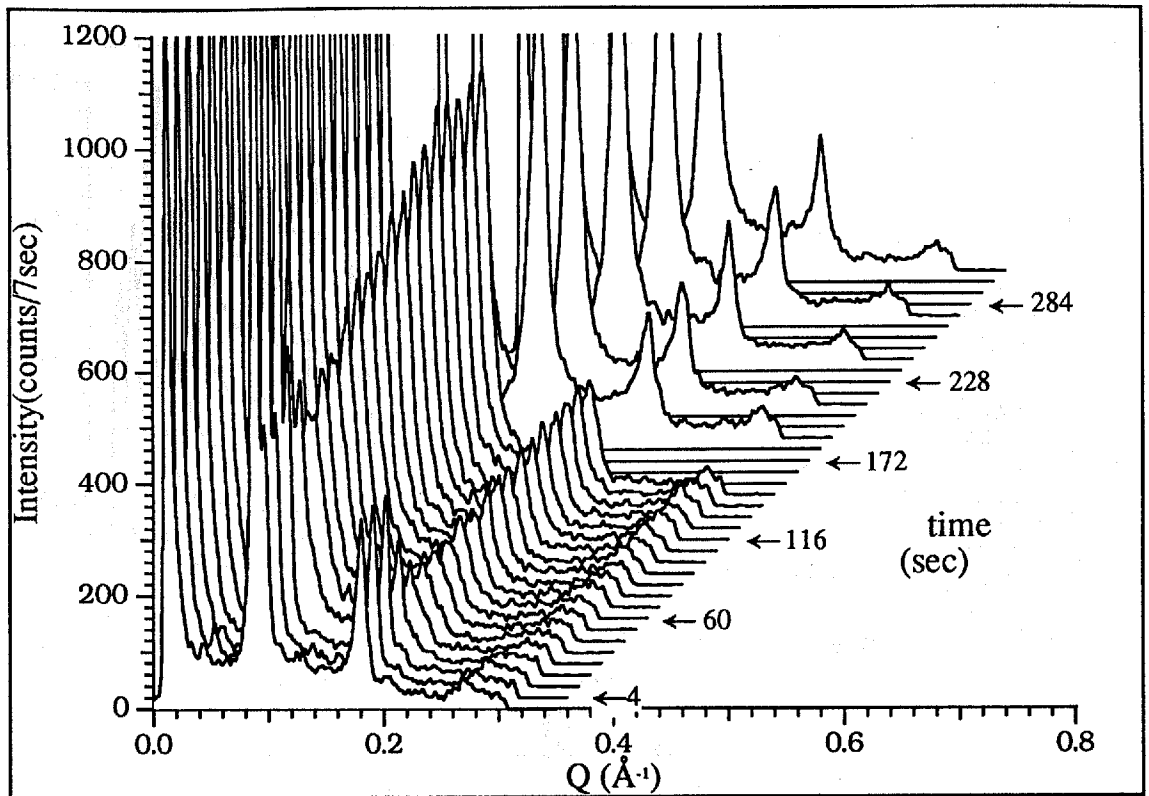
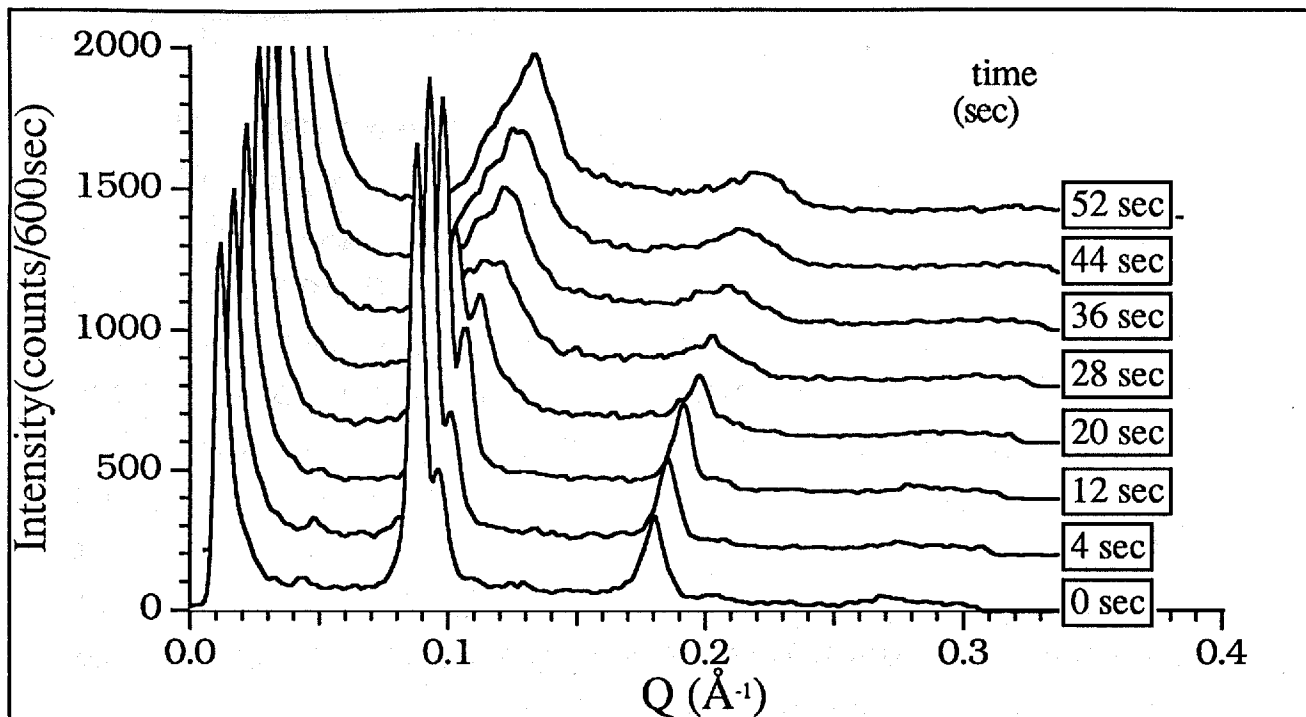
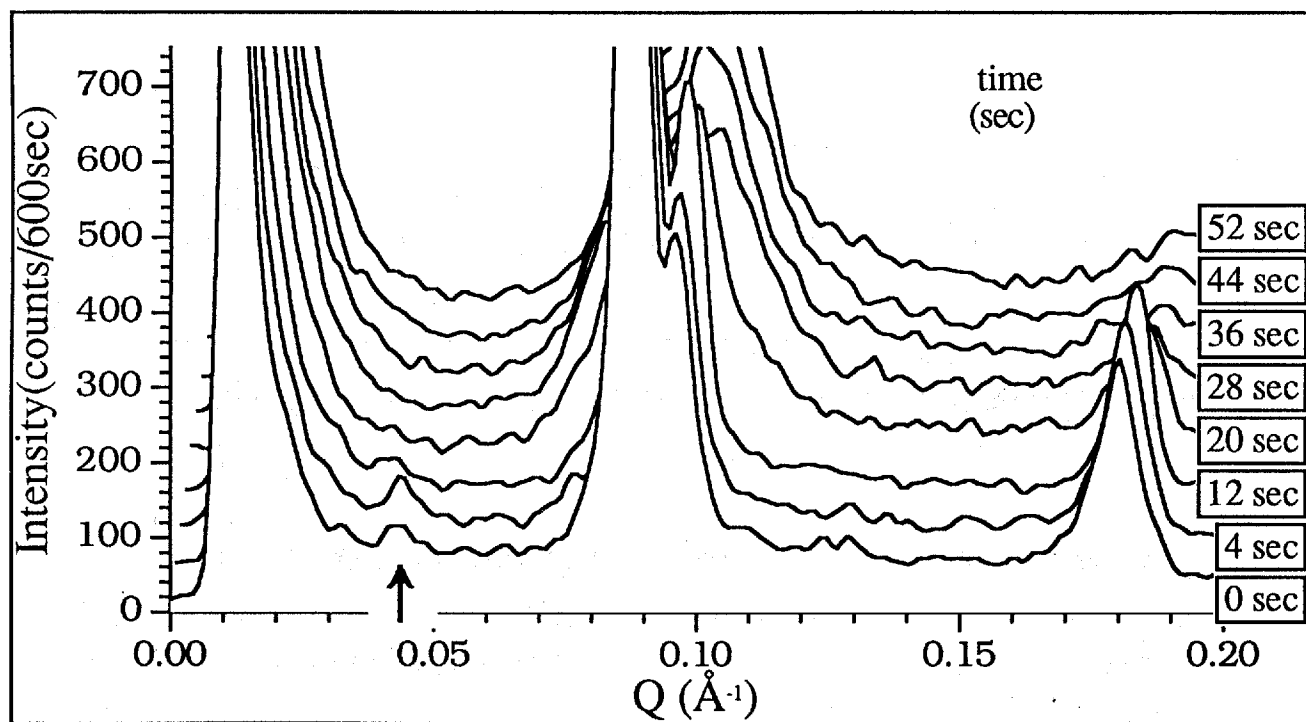


図3-20. $P_{\beta'}$ 相 (37.7°C) から $L_{\beta'}$ 相 (25.3°C)
 へ急冷した時の時分割X線小角散乱パターン (放射光)



(a) 初期 (0~52秒) のパターン全体



(b) 拡大図 (矢印はリップル周期に対応する回折ピーク)

図3-21. 図3-20の時分割X線小角散乱測定結果における初期 (0~52秒) のパターン

3-4. 電子顕微鏡観察の結果

各相の構造を直接観察するため、特にリップル相の P_{β}' 相と P_{β}' (mst)相との違いを探るため、電子顕微鏡観察を行った。試料はフリーズフラクチャー法により白金とカーボンによりDPPC-水系のレプリカを作製した。図3-22は各相の様子を示した電子顕微鏡写真である。これによれば、リップル相には P_{β}' 相、 P_{β}' (mst)相いずれの膜表面もリップルに対応する縞模様で覆われている。更に多くのリップル相の電顕写真を図3-23に示した。これらによれば P_{β}' 相は異なる脂質膜間でリップルの走る方向が揃っている。これに対し、 P_{β}' (mst)相では膜間でリップルの走る方向が乱れているところがあることがわかる。また P_{β}' (mst)相では P_{β}' 相の倍近い周期のリップル構造が現れている。電子顕微鏡観察によって示唆された P_{β}' 相と P_{β}' (mst)相の構造の違い、即ちリップルの走る方向の整列の様子や倍周期リップル構造の有無などは3-3-2節で得られた放射光を用いたX線小角散乱法によるリップル相の構造の測定結果の図3-17と一致する。上記の構造の違いが L_{β}' 相での緩和時間の違いに反映したものと考えられる。

3-5. まとめ

以上の結果をまとめて、次の六つのことがいえる。

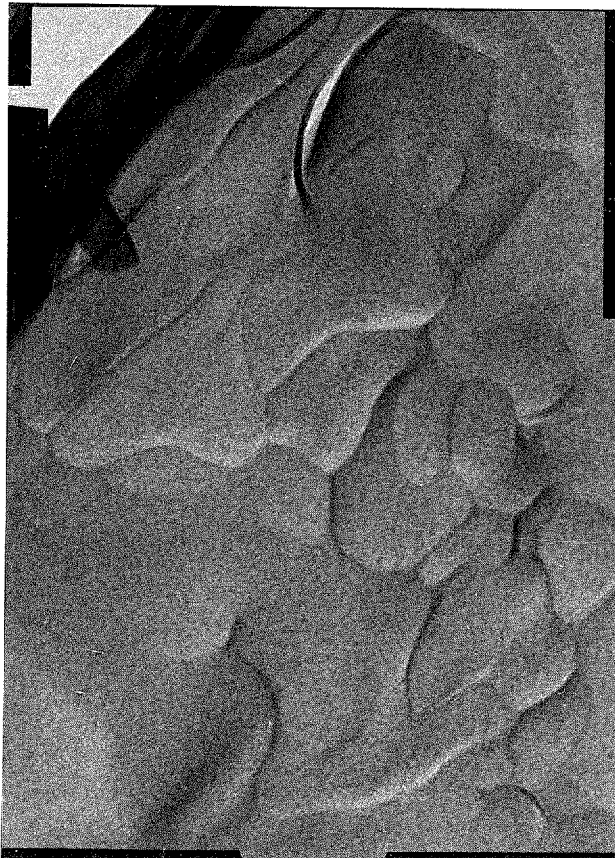
1. DPPC-水系において、温度変化について、履歴現象が見出された。
2. DPPC-水系において、リップル相の温度領域から前転移点を越えて L_{β}' 相の温度領域へ急冷した際に、回折ピーク強度の成長する緩和現象が見出された(図3-2, 3-8, 3-12)。
3. L_{β}' 相の秩序化する緩和過程の緩和時間は、リップル相の温度領域から急冷する目標温度に依存する。この緩和時間の温度依存性はリップル相が P_{β}' 相であるか P_{β}' (mst)相であるかで大きく異なる。この様子は図3-11に顕著に現れている。 P_{β}' (mst)相から L_{β}' 相へ急冷した場合、緩和時間は約25℃で最も小さく、目標温度が25℃よりも高くなるにつれて、また反対に低くなるにつれて、緩和時間は大きくなる。そのため緩和時間と目標温度の関係はU字型の傾向を示す。これに対し P_{β}' 相から L_{β}' 相へ急冷した場合は、



(a) $L_{\beta'}$ 相 $\overline{\hspace{1cm}}$ 2000Å



(b) $P_{\beta'}$ 相 $\overline{\hspace{1cm}}$ 2000Å

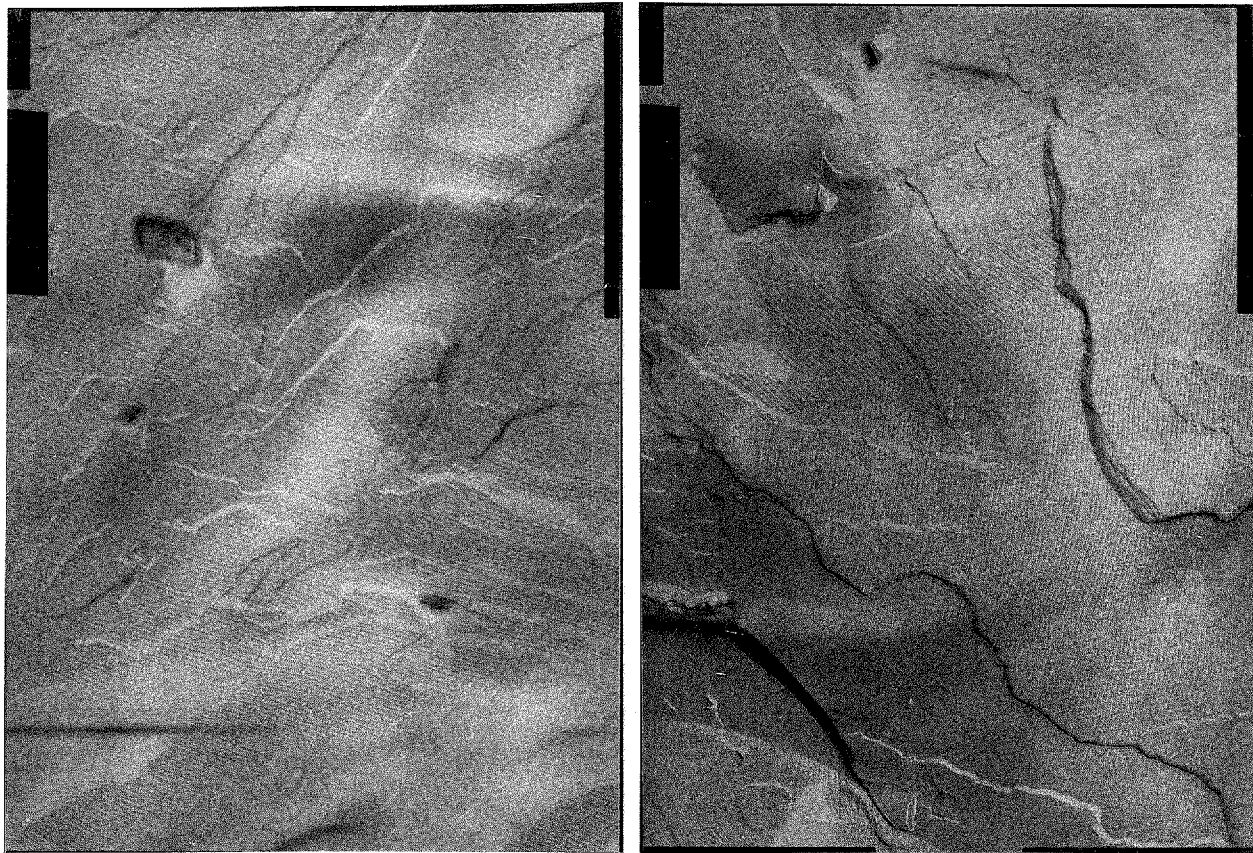


(c) L_{α} 相 $\overline{\hspace{1cm}}$ 2000Å

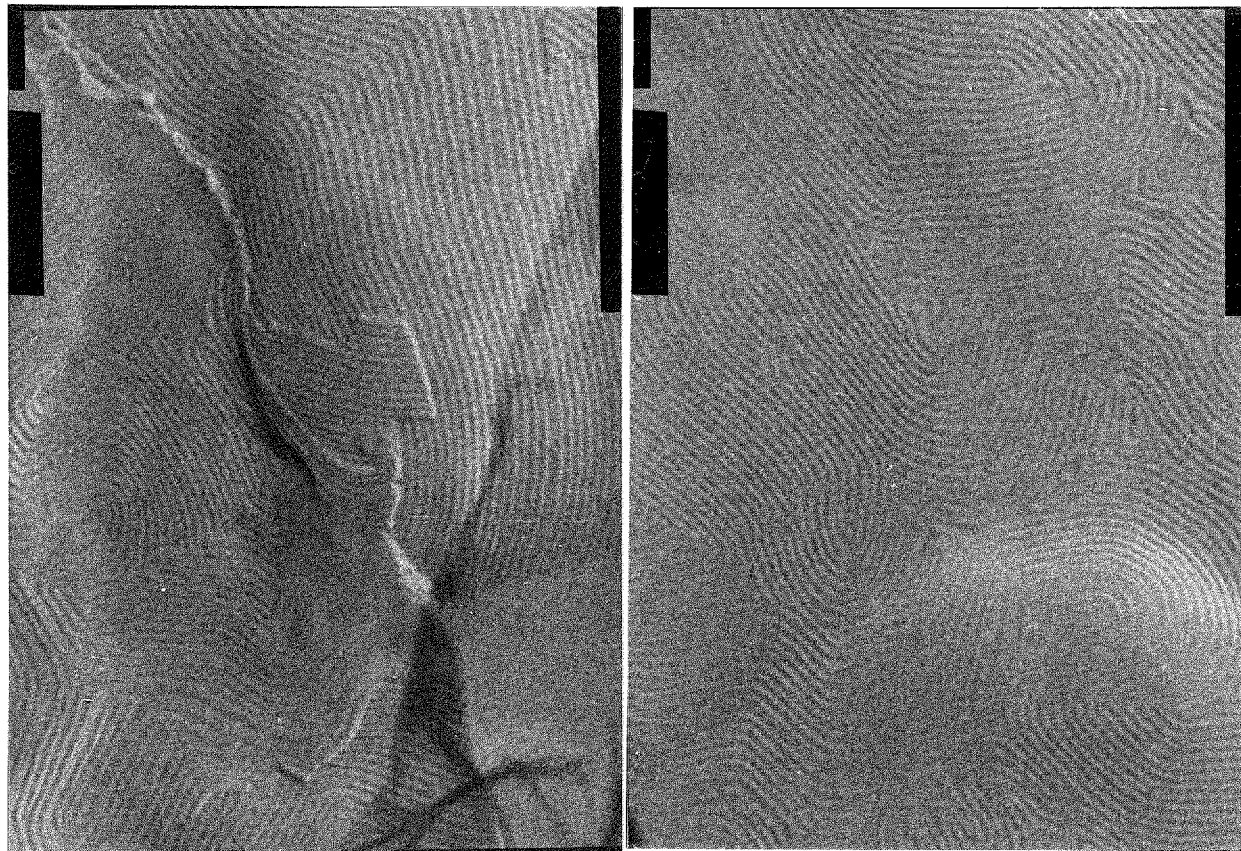


(d) $P_{\beta'}$ (mst) 相 $\overline{\hspace{1cm}}$ 2000Å

図3-22. DPPC-水系の各相の電子顕微鏡写真 (倍率5万倍)



(a) $P_{\beta'}$ 相 $\overline{\hspace{1cm}}$ 2000Å



(b) $P_{\beta'}$ (mst) 相 $\overline{\hspace{1cm}}$ 2000Å

図3-23. リップル相の電子顕微鏡写真 (倍率5万倍)

$P_{\beta'}$ (mst)相から $L_{\beta'}$ 相へ急冷した場合よりも緩和時間は短く、低温になるほど緩和時間は単調に小さくなる傾向がある。

4. $L_{\beta'}$ 相から温度上昇によって得られる $P_{\beta'}$ 相と L_{α} 相から温度降下によって得られる $P_{\beta'}$ (mst)相の回折パターンは大きく食い違っていた。また、どちらの場合も少なくとも数時間の範囲では、その回折パターンに顕著な変化は見られなかった。

5. リップル相から $L_{\beta'}$ 相への緩和現象の初期の構造変化を測定した。その結果、リップル周期に対応する回折ピークが、温度変化後およそ20秒で消滅し、リップル構造の消滅が速いことが示唆された。

6. 電子顕微鏡観察によれば、 $P_{\beta'}$ 相、 $P_{\beta'}$ (mst)相いずれの膜表面もリップルに対応する縞模様で覆われている。そして $P_{\beta'}$ 相は異なる脂質膜間でリップルの走る方向が揃っている。これに対し、 $P_{\beta'}$ (mst)相では膜間でリップルの走る方向が乱れているところのあることがわかる。また $P_{\beta'}$ (mst)相では、倍周期リップル構造が観察された。これらの電子顕微鏡観察の結果は、上記の結果(4)で得た放射光を用いたX線小角散乱法によるリップル相の構造の測定結果と一致する。これらの測定から得られた $P_{\beta'}$ 相と $P_{\beta'}$ (mst)相構造の違いが $L_{\beta'}$ 相での緩和時間の違いに反映したものと考えられる。

第 四 章

考 察

ここでは、まずX線、中性子回折の測定から得られたデータおよび電子顕微鏡観察の結果とこれまで知られている知見をもとにリップル相の温度領域における膜構造のモデルを立ててみる。そして、そのモデルをもとに温度履歴と緩和過程についての定性的説明を試みる。

4-1. リップル相の構造

4-1-1. P_{β}' 相の構造

これまでの知見により P_{β}' 相においては波打ち構造（リップル構造）をとることが知られている。そこで本研究においても膜はリップル構造をとることを基本に考える。図3-17 (a) に示されたX線小角散乱の結果から小さな回折ピークが多数存在するため、膜は図4-1のような単斜晶系の二次元単位胞をもったのこぎり波状の構造をしていると推測して、指数付けを行った。その結果を表4-1に示す。図3-17の括弧の中の数字はこうして求められた指数を表す。この指数付けの結果、簡単な計算から、リップル周期は約 141.8 \AA 、膜面に垂直な繰り返し周期は約 69.0 \AA 、角 γ は約 93.1° と求められる（付録参照）。この結果を、WackとWebb⁽³²⁾ がDPPCについて得た P_{β}' 相の構造に関するデータの水の含量が最も多い場合（33.2%）の値と比較すると、よく一致していることが分かる。また膜は一定間隔で何重にも規則正しく積み重なった累層構造をしていると考えられる。これは、第三章で記述したように電子顕微鏡観察の結果（図3-22 (b), 23 (a)）から P_{β}' 相は異なる脂質膜間でリップルの走る方向が揃っており、また図3-17 (a) の膜のリップル周期に対応する指数 (0, 1) の回折ピークや膜の繰り返し周期に対応する指数 (1, 0) の回折ピークがシャープに現れていることから明らかである。

「第1章. 序論」で記述したように炭化水素鎖の配列・配向および伸縮についてはこれまでに様々な知見が得られている。まず炭化水素鎖の配列は、X線の広角回折の結果⁽⁹⁾により、六方の秩序配列をとることが知られている。

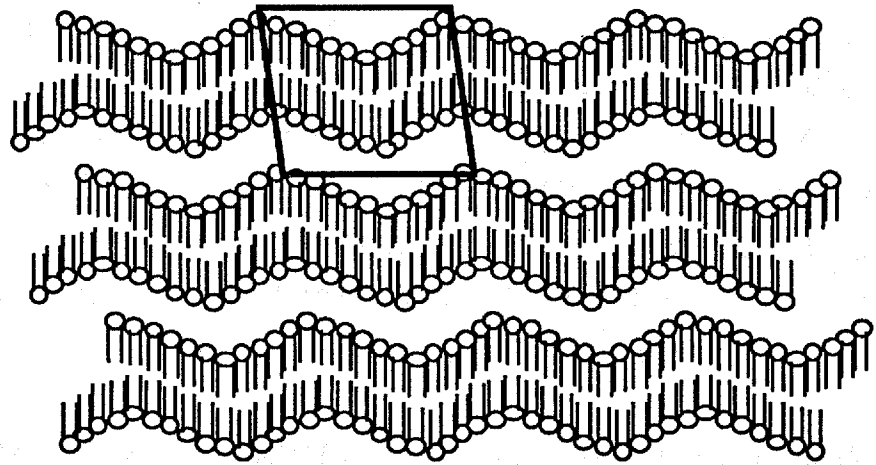


図4-1. リップル構造とその単位胞 (太字枠)

指 数	$Q \text{ (}\text{\AA}^{-1}\text{)}$
0, 1	0. 0443
0, 2	0. 0887
1, 0	0. 091
1, -1	0. 099
1, 1	0. 103
0, 3	0. 133
1, 3	0. 165
2, 0	0. 182
2, -1	0. 185
2, 1	0. 190
2, -2	0. 198
2, 2	0. 207
3, 0	0. 273

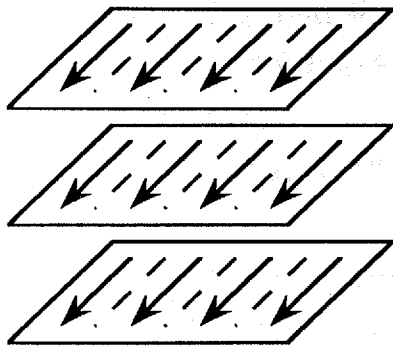
表4-1. $P_{\beta'}$ 相のX線回折パターン (図3-17 (a))
の指数付け

炭化水素鎖の配向は、炭化水素鎖が膜面に対して、一定の傾きを持って配向しているという報告⁽¹⁴⁾と膜上の局所的な部分に対して垂直になっているという報告⁽¹⁵⁾があり、議論の余地が残されている。しかし先に述べた六方の秩序配列に対応する4.19 Åの周期の鋭い回折ピークが観測されていることは膜の積み重ねの方向に対して垂直に配向、したがって膜がリップル構造をとっていると考えると、膜面に対して一定の傾きを持って配向していると考えられる。炭化水素鎖の伸縮については、核磁気共鳴、電子スピン共鳴の測定により、 L_α 相と $L_{\beta'}$ 相の両構造の共存を反映する結果が得られており⁽¹³⁾、 α 状態と β' 状態の両方が共存すると考えられる。その割合は、 α 状態1に対し β' 状態4である⁽¹¹⁾。

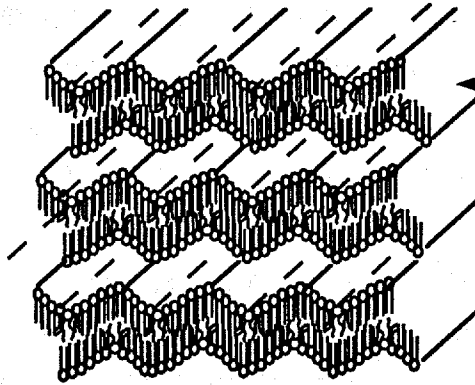
以上を総合すると、 $P_{\beta'}$ 相は図4-2(a)に示されたような構造をとっていると考えられる。即ち膜は周期一定のリップル構造をとっており、一つの膜内はリップルの走る方向が揃った比較的大きなドメインから成り、隣接する脂質膜どうしではリップルの走る方向の揃った膜が等間隔で積み重なった構造をしている。

4-1-2. $P_{\beta'}$ (mst)相の構造

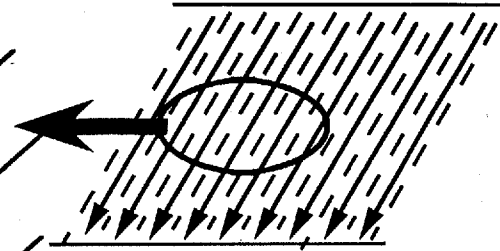
図3-17(b)によれば、 $Q=0.052\text{Å}^{-1}$ と 0.084Å^{-1} に回折ピークがあるが、これは図3-17(a)の $P_{\beta'}$ 相の回折パターンと比較するとそれぞれ指数が(0, 2), (1, 0)に対応する回折ピークであると考えられ、それぞれ約242 Å, 74 Åの周期性に対応する。この二つの数値を $P_{\beta'}$ 相の構造から得られた数値141 Åと69 Åと比較すると、どちらの値も大きくなっている。これらのことから、リップル周期は $P_{\beta'}$ (mst)相においても存在し、膜面に垂直な周期性も存在すると考えられる。一方、図3-17(b)における回折ピークの形状から、明らかに膜の累層構造およびひとつの膜のリップル周期、それに膜に垂直な周期性に、乱れの生じていることが予想される。そして、膜に垂直な周期性が69 Åから74 Åに増加したことは、隣接する膜の積み重ねの不整合によるためと考えられ、この点でも膜の累層構造や膜そのもののリップル周期に乱れが生じていることを示唆していると考えられる。ところで電子顕微鏡観察の結果、図3-22(d), 3-23(b)によれば $P_{\beta'}$ (mst)相では膜間でリップルの走る方向が乱れているところのあることが明らかであるが、リップル周期に顕著な乱れは見つからない。したがって、X



隣接する脂質膜間の様子

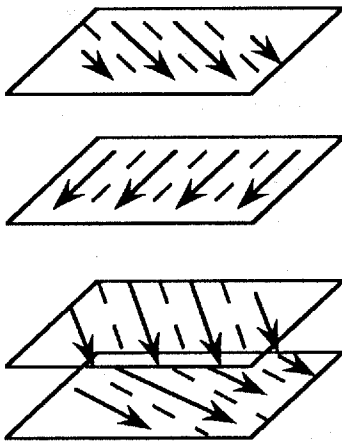


脂質膜内および膜間の様子（一部分）

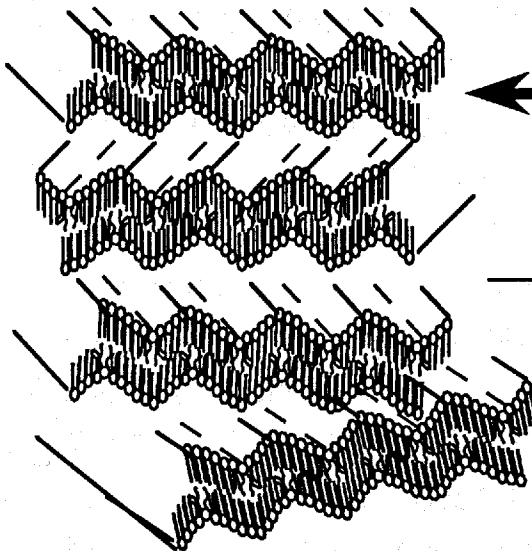


一つの脂質膜内の様子

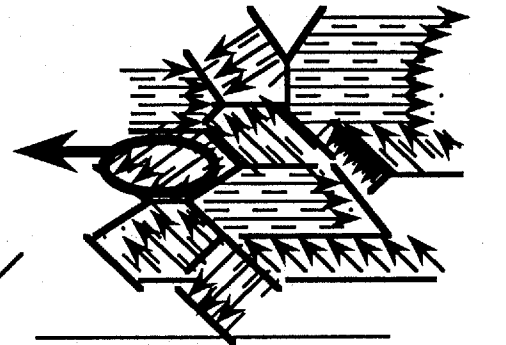
(a) P_{β}' 相



隣接する脂質膜間の様子



脂質膜内および膜間の様子（一部分）



一つの脂質膜内の様子

(b) P_{β}' (mst) 相

図4-2. リップル相のモデル

線の測定結果からの知見と電子顕微鏡観察の結果からの知見をまとめると、 $P_{\beta'}$ (mst)相の膜の形状について以下のことが考えられる。

$P_{\beta'}$ (mst)相は、膜のリップル周期が一定で、異なる膜間のリップルの走る方向に乱れがある。この乱れは、異なる膜間の積み重なりにも影響する。異なる膜間のリップルの走る方向が揃っているところに比べて、乱れているところは膜の繰返し周期が大きくなる。したがって膜の繰返し周期に乱れが生じている。

炭化水素鎖の伸縮については、主転移点以下に温度を下げたため、炭化水素鎖が自由に回転できなくなり、 α 状態から β' 状態へ変化したと考えられる。リップル構造の存在が β' 状態の存在を裏付けている。しかし同時に、 $P_{\beta'}$ 相の場合同様に、リップル構造の存在は、 α 状態も存在する根拠にもなる。すなわち図4-2(a), (b)に示されているように炭化水素鎖が α 状態の部分で膜が折れ曲がりリップル構造を形成すると考えられる。炭化水素鎖の膜面内の配列および膜面の法線方向から傾いて揃った配向の様子については、炭化水素鎖が自由に垂直軸のまわりに回転している L_{α} 相とは異なり、炭化水素鎖が一方向に配向して並ぶことができず乱れの生じることが予想される。即ち、鎖の配列も配向もある程度の乱れが生じていると考えられる。しかし、リップル構造が生じるためには、膜内における炭化水素鎖の配向が必要である。電子顕微鏡写真、図3-23(a), (b)を詳しく見ると $P_{\beta'}$ 相では何層にもわたって写真の視野いっぱい直線状にリップルが走っている場合が多いのに対し、 $P_{\beta'}$ (mst)相の場合は一つの膜面内におけるリップルの形状が曲線状、渦巻状あるいは比較的短い直線が目立つ。即ち $P_{\beta'}$ (mst)相の場合、一つの膜面内におけるリップルは $P_{\beta'}$ 相の場合に比べて比較的小さいドメインを形成していると考えられる。この膜内のドメイン間の炭化水素鎖の配向の乱れが、膜のリップル周期や累層構造の乱れに影響していると考えられる。以上をまとめると、 $P_{\beta'}$ (mst)相の構造は図4-2(b)のようであると考えられる。即ち膜は周期一定のリップル構造をとっており、一つの膜内にはリップルの走る方向の異なる比較的小さいドメインが多数存在している。隣接する脂質膜どうしではリップルの走る方向が異なるため、膜間隔は乱れている。

4-2. リップル相から $L_{\beta'}$ 相への緩和過程

4-2-1. 結果の整理と解釈の視点

3-5節「結果のまとめ」について考える。緩和現象は、 L_{β}' 相の温度領域であること、時間とともに強度の増える回折ピークの位置が L_{β}' 相の繰返し周期に相当することから、 L_{β}' 相の秩序化する過程であると考えられる。そして、緩和時間の大きさの相違および緩和時間の温度依存性の異なる二つの振舞いは明らかに L_{β}' 相へ急冷する際の元のリップル相が P_{β}' 相であるか P_{β}' (mst)相であるかによると考えられる。換言すれば P_{β}' 相と P_{β}' (mst)相との構造の違いが緩和過程の速さおよび緩和時間の温度依存性の相違に反映したと考えられる。したがって緩和時間の大きさおよび緩和時間の温度依存性の結果を理解するためには P_{β}' 相と P_{β}' (mst)相との構造およびその緩和過程に伴う構造変化の様子に注目する必要がある。

4-2-2. 緩和過程に伴うリップル相の構造変化の様子

(a) P_{β}' 相と P_{β}' (mst)相との構造の相違点

4-1節で記述したことから P_{β}' 相と P_{β}' (mst)相との相違点をまとめると次の三点になる。

1. P_{β}' (mst)相のリップル周期は P_{β}' 相のその約1.7倍である。
2. P_{β}' 相においてはリップルの走る方向が異なる膜間で揃っているのに対し、 P_{β}' (mst)相においてはリップルの走る方向が異なる膜間で揃っていない。このことは膜間の繰返し周期がほぼ一定であるか乱れを生じているかということにつながっている。
3. 一つの脂質膜で脂質分子の炭化水素鎖の配向によるドメインの大きさ。即ち P_{β}' 相は配向がよく揃っているのに対し、 P_{β}' (mst)相は配向の異なる比較的小さなドメインが現れている。

このうち第一点目の倍周期リップル構造であるかどうかについては、放射光による時分割X線小角散乱法による速い緩和過程の測定結果(図3-18~21)より(P_{β}' 相 $\rightarrow L_{\beta}'$ 相)および(P_{β}' (mst)相 $\rightarrow L_{\beta}'$ 相)のいずれの場合もリップル周期に対応する $Q \sim 0.05 \text{ \AA}^{-1}$ の回折ピークが温度変化開始後20秒以内に消えていることから、ここで議論している緩和時間の大きさおよび緩和時間の温度依存性の相違には関係ないと思われる。

二点目については、一つの脂質膜に炭化水素鎖の配向の異なる比較的小さなドメインが多数存在すると、隣接する二つの異なる脂質膜間でリップルの

走る方向が異なる可能性が大きくなる。したがって、小さなドメインが出現し易い P_{β}' (mst)相の場合リップルの走る方向が異なり、その結果膜間の繰返し周期が揃わず乱れが生じると考えられる。つまり、上記第二点の隣接する二つの異なる脂質膜間でリップルの走る方向が異なることは、第三点に記述されている一つの脂質膜の炭化水素鎖の配向の異なる比較的小さなドメインの存在に帰着する。

(b) P_{β}' 相と P_{β}' (mst)相の構造変化

「第三章 結果」で記述したように緩和過程の初期の結果を表す図 3-19 および図 3-21 によればリップル周期が 12~20 秒程度で消失するが、脂質膜の繰返し周期に対応する回折ピークの振舞いはリップル相が P_{β}' 相であるか P_{β}' (mst)相であるかで大きく異なっている。

リップル相が P_{β}' 相の場合は前転移点を通過した直後に P_{β}' 相の繰返し周期に対応する回折ピーク ($Q \sim 0.085 \text{ \AA}^{-1}$) の強度が減少し、回折ピークのはやけた状態を経て L_{β}' 相の繰返し周期に対応する回折ピーク ($Q \sim 0.095 \text{ \AA}^{-1}$) が成長し始め、その後急速に回折ピークが出現している (図 3-20, 21)。この様子からリップル構造が消えつつ同時に一定値をとっていた繰返し周期も急速に乱れ間隔が減少し L_{β}' 相の繰返し周期の値に揃いつつある構造変化が示唆される。

これに対し、リップル相が P_{β}' (mst)相の場合は、繰返し周期に対応するシャープな回折ピークは存在せず、始めから繰返し周期の乱れた状態が出現している (図 3-18, 19)。そしてリップル周期が消失する初期の変化は乏しく徐々に乱れた回折ピークの形が変わり始め、時間とともに比較的ゆっくりと $Q \sim 0.095 \text{ \AA}^{-1}$ の位置に L_{β}' 相の繰返し周期に対応する回折ピークが成長している。これは、リップル構造が消失した後、もともと乱れていた繰返し周期は変化が遅く、ゆっくりと L_{β}' 相の繰返し周期の値に揃いつつある構造変化をしていると考えられる。

4-2-3. 緩和過程の結果の定性的解釈

膜間距離の乱れは、膜内の炭化水素鎖の配向の乱れと密接に関係があると考えられる。膜内の炭化水素鎖が配向のよく揃った比較的小さなドメインを形成しているとすれば異なるドメイン間の境界領域で歪みを生じ易い。その結

果排除体積効果により、この境界領域では脂質膜は盛り上がり、平坦でなくなると考えられる。このような場所が多数存在すると膜間距離の乱れとして影響を与えると考えられる。そこでリップル相から L_{β}' 相への緩和過程を膜内の炭化水素鎖軸の配向が時間とともによく揃う過程として考えてみる。

前転移点（約34℃）に比較的近い温度領域ではリップル相がどちらの場合も緩和時間は大きい。これは脂質膜内で脂質分子の復元力が小さくなるために生じる臨界緩和現象（クリティカルスローイングダウン）のため脂質膜の秩序化が遅くなる。

前転移点から離れた温度領域では、炭化水素鎖の配向がある一定の方向に揃う‘核生成・成長’過程が進むと考えられる。 P_{β}' 相から急冷した場合は脂質膜内の脂質分子炭化水素鎖の配向が揃った大きなドメインを形成しているため、 L_{β}' 相の温度領域ではこれが比較的短時間でさらに大きなドメインに成長し易いと考えられる。この‘核生成・成長’過程は転移点からの温度差が大きいほど、復元力が大きいため、目標温度が低温になるほど小さな緩和時間で L_{β}' 相に秩序化される。これに対し P_{β}' (mst)相から急冷した場合は、もともと一つの脂質膜内では炭化水素鎖の配向の揃った小さなドメインが多数存在しているため配向を揃えようとする分子の回転拡散が遅くなるため、炭化水素鎖の配向の揃った大きなドメインの成長が妨げられると考えられる。

第 五 章

結 論

DPPC-水系について、温度変化に伴う構造相転移について、回折学的方法を用いて、研究を行った結果、以下の知見が得られた。

1. 温度変化過程において、加熱過程と冷却過程の間で、リップル相の温度領域において、散乱パターンの変化する履歴現象が見出された。

2. リップル相から L_{β}' 相の温度領域に急冷した後、そのまま一定温度に保ち続け、その温度における散乱パターンの経時変化を測定したところ、 L_{β}' 相の膜面に垂直な繰返し周期に対応する回折ピークの成長する緩和現象が見出された。

3. この緩和現象は、リップル相の状態によって緩和時間が大きく異なる。 P_{β}' 相から L_{β}' 相の温度領域に急冷した場合の緩和過程は速く、その緩和時間は温度により異なるが約 $2\sim 3^{\circ}\text{C}$ 以下で3分以下である。これに対し、 $P_{\beta}'(\text{mst})$ 相から L_{β}' 相の温度領域に急冷した場合の緩和過程は一般に遅く、その緩和時間は温度により異なるが数十分から数百分である。

4. 緩和時間の急冷する目標温度依存性は、リップル相の状態によって大きく異なる。 P_{β}' 相から L_{β}' 相の温度領域に急冷した場合、目標温度が低温になるほど緩和時間が単調に小さくなった(図3-11)。これに対し、 $P_{\beta}'(\text{mst})$ 相から L_{β}' 相の温度領域に急冷した場合、緩和時間は急冷する目標温度が約 $25^{\circ}\text{C}\sim 26^{\circ}\text{C}$ で最も小さく、目標温度がこれらの温度よりも高くなるにつれて、また反対に低くなるにつれて、緩和時間は大きくなる。そのため、緩和時間と目標温度の関係は図3-7, 11のようにU字型の傾向を示すという知見が得られた。

5. X線小角散乱法の結果、電子顕微鏡による直接観察の結果およびこれまで得られている知見・モデルからリップル相における構造について推測した。

P_{β}' 相は、図4-1、付録図1のような、単斜晶系の基本単位格子を持ち、リップル周期約140Åで、のこぎり波の形をしたリップル構造の膜が等間隔（繰返し周期69.0Å）で積み重なっている。一つの膜面についてはリップルの走る方向の揃った比較的大きなドメイン（直径1万~数万Å）が存在している。隣接する膜面間に対してもリップルの走る方向が揃っている。一方、 P_{β}' (mst)相では、比較的小さなドメイン（直径数千~1万Å）が多数存在していると考えられる。膜には、約240Åの倍周期リップル構造が存在している。多数の小さなドメインの存在により、リップルの走る方向が膜間で異なり、したがって膜間の周期性には乱れが生じている。 P_{β}' 相および P_{β}' (mst)相の様子は、それぞれ図4-2 (a) および (b) の様であると推測される。

以上本研究において得られた知見をまとめてみた。上記のまとめのうち、リップル相の膜内部の脂質分子の挙動については触れていない。今後はESR、MNR等を用いた炭化水素鎖の配向の様子や、X線広角回折によるリップル相の炭化水素鎖の配列の様子、フリーズフラクチャー電顕法によるさらに詳細な脂質膜内および膜間の直接観察、更には構造モデルに基づくコンピューターシミュレーションによる解析等により、リップル相の構造をよりはっきりしたものにし、またそれによって動的構造変化の様子も明らかにすることが望まれる。

謝 辞

本研究は著者が広島大学大学院生物圏科学研究科在籍中に好村研究室において行った実験結果をまとめたものである。

本研究を行うにあたり、終始懇切なる御指導を戴きました広島大学総合科学部の好村滋洋教授ならびに豊島喜則教授（現在は京都大学教授）、武田隆義助教授に深く感謝いたします。論文作製にあたっては渡部三雄教授ならびに田村剛三郎教授、渡邊一雄助教授に御指導を戴き深く感謝いたします。また常に適切な助言および良好な研究環境を与えて戴きました瀬戸秀紀助手に深く感謝いたします。中性子回折実験では赤堀興造教授ならびに京都大学原子炉実験所の秋吉恒和講師はじめ京都大学原子炉実験所の方々に、放射光の実験では高エネルギー物理学研究所放射光実験施設の雨宮慶幸助教授に、フリーズフラクチャー法によるレプリカ作製では広島大学医学部の片岡勝子教授ならびに森野恵理助手に、電子顕微鏡観察では広島大学総合科学部の重中義信教授ならびに洲崎敏伸助手に御指導・御協力を尽くして戴き深く感謝いたします。各種実験にあたっては広島大学総合科学部好村研究室の宮崎年雄氏（現在はダイセル化学工業）はじめ広島大学総合科学部好村研究室ならびに豊島研究室、藤井研究室の方々に御協力、御便宜を尽くして戴き深く感謝いたします。また文書作製にあたり、広島大学総合科学部好村研究室の小林秀樹氏に御協力を尽くして戴き、深く感謝いたします。

付 録

A. $P\beta'$ 相のリップル周期, 繰返し周期および角 γ の決定と 指数付けの計算

付録図1 (a) のような格子の基本並進ベクトル a , b に対してそれぞれ垂直な方向に逆格子空間の基本ベクトル b^* , a^* をとる。散乱ベクトル Q は a^* , b^* を用いて次式のように表せる。

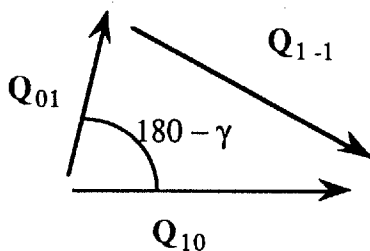
$$Q = ha^* + kb^*$$

したがって散乱ベクトル Q は指数 (h, k) により付録図1 (b) のような逆格子空間の任意の位置に存在すると表現できる。

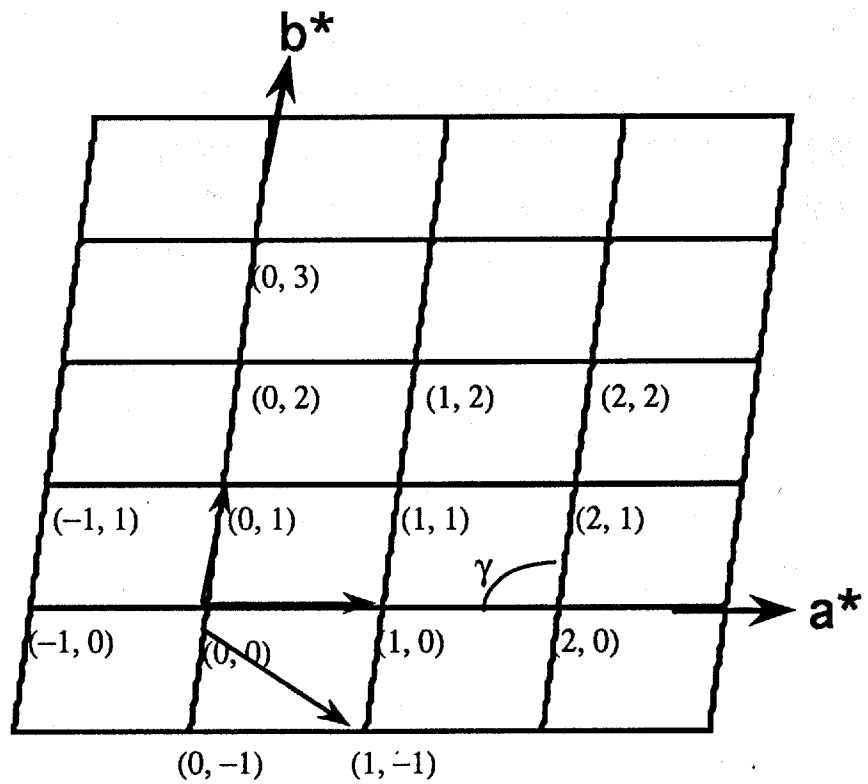
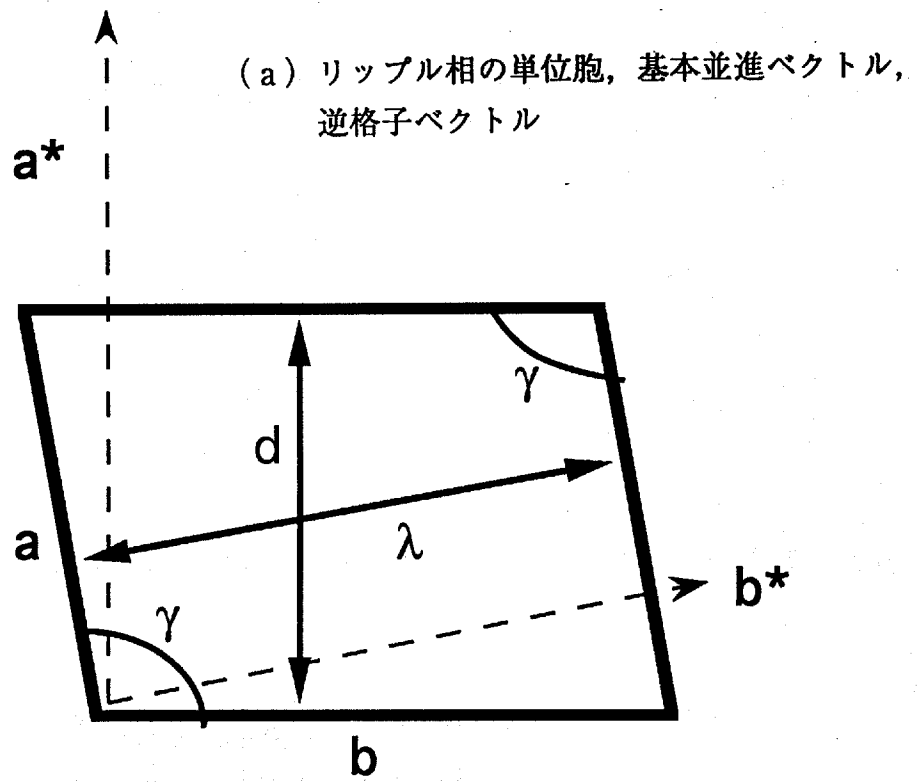
付録図1 (a) では、周期性の長い方から順に b^* 方向の周期性 (リップル周期 λ に対応), a^* 方向の周期性 (膜の繰返し周期 d に対応) がある。これを付録図1 (b) の逆格子空間に対応させると、それぞれリップル周期 λ に対応するのが $(0, 1)$, 膜の繰返し周期 d に対応する指数が $(1, 0)$ である。散乱ベクトル Q は散乱角 2θ に比例するため、逆格子空間で距離の短い指数に対応する周期性ほど低角度側に Bragg ピークが現れる。したがって低角度側から順に $(0, 1)$, $(1, 0)$, $(1, -1)$, $(1, 1)$ の指数に対応する Bragg ピークが現れる。図3-17 (a) の指数 $(0, 1)$, $(1, 0)$, $(1, -1)$ はこのようにして決められた。この三つの指数に対応する散乱ベクトル Q の値 (表4-1) からリップル周期 λ , 膜の繰返し周期 d が次式により求まる。

$$d = \frac{2\pi}{Q_{10}}, \quad \lambda = \frac{2\pi}{Q_{01}}$$

また二次元格子の内角 γ が下図を用いて余弦定理より以下のように求められる。



$$\begin{aligned} Q_{01} &= 0.0443 \text{ \AA}^{-1} , \\ Q_{10} &= 0.091 \text{ \AA}^{-1} , \\ Q_{1-1} &= 0.099 \text{ \AA}^{-1} . \end{aligned}$$



付録図1. リップル相の構造の指数付け

$$\begin{aligned}\cos (180 - \gamma) &= \frac{Q_{01}^2 + Q_{10}^2 - Q_{1-1}^2}{2 \cdot Q_{01} \cdot Q_{10}} \\ &= \frac{0.0443^2 + 0.091^2 - 0.099^2}{2 \cdot 0.0443 \cdot 0.091} \\ &= 0.0549\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}180 - \gamma &= 86.85^\circ \\ \therefore \gamma &= 93.1^\circ\end{aligned}$$

さらに角度 γ が得られたことにより、格子の a および b の長さが次式により求まる。

$$\begin{aligned}a &= \frac{d}{\sin \gamma} = \frac{69.0}{\sin 93.1} = 69.1 (\text{\AA}) \\ b &= \frac{\lambda}{\sin \gamma} = \frac{141.8}{\sin 93.1} = 142.0 (\text{\AA})\end{aligned}$$

(0, 1), (1, 0), (1, -1) 以外の指数はこの三つの逆格子ベクトルの大きさと角度 γ より、付録図 1 (b) の逆格子空間の位置関係から余弦定理を用いて順次求めることができる。そのようにして計算して得られた結果と図 3-17 の測定結果を照合させたのが表 4-1 である。

表および図の説明

- 表1-1. リン脂質-水系の多形
表1-2. リン脂質-水系の相転移に関する熱測定データ
表4-1. P_{β}' 相のX線回折パターン (図3-17 (a)) の指数付け
- 図1-1. dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) の構造式
図1-2. 低温相と高温相における炭化水素鎖の状態
図1-3. DPPC-水系の水濃度依存性
図1-4. DPPC-水系の相
図1-5. DPPC- D_2O 系の中性子小角散乱パターン
図1-6. 37°C から急冷した場合の L_{β}' 相の緩和時間の温度依存性
図2-1. 脂質二重層膜の膜面に垂直な方向の散乱振幅密度関数
 (a) DPPC- H_2O 系 (X線)
 (b) DPPC- D_2O 系 (中性子)
図2-2. (a) 脂質二重層膜に対するX線の散乱強度の計算値
 (b) 脂質二重層膜に対する中性子の散乱強度の計算値
図2-3. (a) X線回折用サンプルホルダー
 (b) X線回折用サンプルホルダーの断面図
図2-4. 中性子回折用サンプルホルダー
図2-5. X線回折装置系 (実験室)
図2-6. (a) 放射光実験施設におけるX線回折装置系の概観
 (b) 放射光実験施設における測定系および温度制御系の配置図
図2-7. 中性子回折装置系
図2-8. レプリカ作製用サンプル台
図3-1. 中性子小角散乱法によるDPPC-水系の散乱パターンの温度変化
図3-2. P_{β}' (mst)相 (36.0°C) から L_{β}' 相 (24.6°C) へ急冷した時の中性子小角散乱パターンの時間変化
図3-3. L_{β}' 相 (24.7°C) から P_{β}' 相 (39.0°C) へ昇温した時の中性子小角散乱パターンの時間変化
図3-4. P_{β}' 相 (38.0°C) から L_{α} 相 (45.6°C) へ昇温した時の中性子小角散乱パターンの時間変化

- 図3-5. L_{α} 相 (45.0°C) から $P_{\beta'}$ (mst)相 (38.4°C) へ急冷した時の中性子小角散乱パターンの時間変化
- 図3-6. 図3-2において特定のQ値ごとの散乱断面積の時間変化
- 図3-7. 中性子散乱断面積の時間変化より求めた緩和時間の温度依存性
- 図3-8. X線小角散乱法 (実験室) による $P_{\beta'}$ (mst)相 (37.7°C) から $L_{\beta'}$ 相 (15.0°C) へ急冷した際の散乱パターンの時間変化
- 図3-9. ローレンツ関数によるX線小角散乱パターンの最適曲線
- 図3-10. X線小角散乱法 (実験室) による $P_{\beta'}$ (mst)相から $L_{\beta'}$ 相の温度領域へ急冷した際の各温度別の一次回折ピーク強度の時間変化
- 図3-11. X線一次回折ピーク強度の時間変化より求めた緩和時間の温度依存性
- 図3-12. X線小角散乱法 (実験室) による $P_{\beta'}$ 相 (37.7°C) から $L_{\beta'}$ 相 (15.0°C) へ急冷した際の散乱パターンの時間変化
- 図3-13. X線小角散乱法 (実験室) による $P_{\beta'}$ 相 (37.7°C) から $L_{\beta'}$ 相 (15.0°C) へ急冷した際の一次回折ピーク強度の時間変化
- 図3-14. X線小角散乱法 (実験室) による $P_{\beta'}$ 相から $L_{\beta'}$ 相の温度領域へ急冷した際の各温度別の一次回折ピーク強度の時間変化
(a) 0~1000min, (b) 0~100min
- 図3-15. X線小角散乱法 (放射光) による、 $P_{\beta'}$ 相 (37.7°C) から $L_{\beta'}$ 相 (23.2°C) へ急冷した際の一次回折ピーク強度の時間変化
- 図3-16. (a) 加熱過程におけるX線小角散乱パターン (放射光) の温度変化 (7.4°C~55.3°C)
- 図3-16. (b) 冷却過程におけるX線小角散乱パターン (放射光) の温度変化 (55.3°C~25.0°C)
- 図3-17. リップル相におけるX線小角散乱パターン (放射光)
(a) $P_{\beta'}$ 相, (b) $P_{\beta'}$ (mst)相
- 図3-18. $P_{\beta'}$ (mst)相 (37.7°C) から $L_{\beta'}$ 相 (24.6°C) へ急冷した時の時分割X線小角散乱パターン (放射光)
- 図3-19. 図3-18時分割X線小角散乱測定結果における初期 (0~52秒) のパターンの拡大

図3-20. P_{β}' 相 (37.7°C) から L_{β}' 相 (25.3°C) へ急冷した時の時分割X線小角散乱パターン (放射光)

図3-21. 図3-20の時分割X線小角散乱測定結果における初期 (0~52秒) のパターン

(a) 初期 (0~52秒) のパターン全体, (b) 拡大図

図3-22. DPPC-水系の各相の電子顕微鏡写真 (倍率5万倍)

図3-23. リップル相の電子顕微鏡写真 (倍率5万倍)

図4-1. リップル構造とその単位胞 (太字枠)

図4-2. リップル相のモデル

(a) P_{β}' 相, (b) P_{β}' (mst)相

付録図1. リップル相の構造の指数付け

参考文献

- (1) 美宅成樹 : パリテイ 2 No.3(1987) p.26-36.
- (2) 香川靖雄 : 「生体膜」 (岩波全書307, 岩波書店, 1978) ,
Tardieu, A., Luzzati, V. & Reman, F. C. : *J. Mol. Biol.* 75 (1973) p.711-733.
- (3) 豊島喜則 : 「膜の機能」 (共立化学ライブラリー13, 共立出版, 1977)
第三章
- (4) Ladbrooke, B., D. and Chapman, D.: *Chem. Phys. Lipids* 3 (1969) p.304-.
- (5) 大西俊一 : 「生体膜の動的構造」 (UP BIOLOGY 38, 東京大学出版会,
1980)
- (6) Small, D., M.: *The Physical Chemistry of Lipids* (Handbook of Lipid
Research 4) , 1986, Plenum Press, New York.
- (7) Chen, S. C. and Sturtevant, J. M.: *Biochemistry* 20 (1981) p.713-.
- (8) Magni, R. and Sheridan, J. P.: Abstracts of the 26th Annual Meeting, Feb.
14-17, 1982, Boston, *Biophys. J.* 37 (1982) 11a.,
Yang, C., P. and Nagle, J., F.: *Phys. Rev A* 37 (1988) p.3993-4000.
- (9) Ruocco, M., J. and Shipley, G., G. : *Biochem. Biophys. Acta* 691 (1982)
p.309-320.
- (10) Janiak, M., J., Small, D., M. and Shipley, G., G. : *Biochemistry* 15 (1976)
p.4575-4580
- (11) Tsuchida, K. and Hatta, I. : *Biochem. Biophys. Acta* 945 (1988) p.73-80.
- (12) Doniach, S. : *J. Chem. Phys.* 70 (1979) p.4587-4596.
- (13) 八田一郎 : 生物物理 28 (1988) p.182-185.
- (14) Janiak, M., J., Small, D., M. and Shipley, G., G. : *J. Biol. Chem.* 254
(1979) p.6068-6078.
- (15) Meier, P., Blume, A., Ohmes, E., Neugebauer and Kothe, F., A. :
Biochemistry 2 (1982) p.526-534.
- (16) Tenchov, B., G., Yao, H. and Hatta, I. : *Biophys. J.* 56 (1989) p.757-768.
- (17) Hinz, H., J. and Sturtevant, M., J. : *J. Biol. Chem.* 247 (1972) p.6071-.
- (18) Komura, S., Toyoshima, Y., Takeda, T.: *Jpn. J. Appl. Phys.* 21 (1982)
p.1370-1372.
好村滋洋 : 一般研究A 「中性子スピンエコー法による水素化金属,
スピングラス, 高分子溶液の素励起の研究」 報告書 (平成3年
(1989) 3月)

- (1 9) Komura, S., Toyoshima, Y. and Takeda, T.: *Jpn. J. Appl. Phys.* 21 (1982) 1370-1372.
- (2 0) Takeda, T., Akabori, K., Toyoshima, Y., Komura, S. and Takebe, Y. : *Jpn. J. Appl. Phys.* 26 (1987) p.1791-1793.
- (2 1) Takeda, T., Ueno, S., Komura, S., Toyoshima, Y. and Akabori, K. : *Dynamics of Ordering Process in Condensed Matter* (Edited by Komura,S. and Furukawa,H.) p.543-548 (1988, Plenum Press, New York).
- (2 2) Lentz, B. R., Freire, E. and Biltonen, R. L.: *Biochemistry* 17 (1978) 4475-4480.
- (2 3) Cho, K., C., Choy, C., L. and Young, K. : *Biochem. Biophys. Acta* 662 (1981) p.14-21.
- (2 4) Akiyama, M., Terayama, Y. and Matsushima, N. : *Biochem. Biophys. Acta* 687 (1982) p.337-339.
- (2 5) Tsuchida, K., Hatta, I., Imaizumi, S., Ohki, K. and Nozawa, Y. : *Biochem. Biophys. Acta* 812 (1985) p.249-254
- (2 6) Tsuchida, K., Ohki, K., Sekiya, T., Nozawa, Y. and Hatta, I. : *Biochem. Biophys. Acta* 898 (1987) p.53-58
- (2 7) Laggner, P. : *Top. Curr. Chem.* 145 (1988) p.173-202.
- (2 8) 雨宮慶幸 : 日本結晶学会誌 27 (1985) p.119-127.
- (2 9) Komura, S., Takeda, T., Fujii, H., Toyoshima, Y., Osamura, K., Mochiki, K. and Hasegawa,K. : *Jpn. J. Appl. Phys.* 22 (1983) p.351-356.
- (3 0) Ueno, S., Takeda, T., Komura, S. and Toyoshima, Y. : *Dynamics and Patterns in Complex Fluids* edited by A. Onuki and K. Kawasaki (Springer Proceedings in Physics, Vol.52), pp.38-39, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1990.
- (3 1) Ueno, S., Takeda, T., Komura, S. and Seto, H. : *J. Appl. Cryst.* 24 (1991) p.843-846.
- (3 2) Wack, D. and Webb, W. : *Phys. Rev. A* 40 (1989) p.2712-2730.