

生体膜上の分子運動

—何を測ると何がわかるか—

境界脂質

B. 各種測定法の比較

木下一彦・池上 明

境界脂質とバルク脂質の運動性を調べるのに使われた測定法のうち、電子スピン共鳴、核磁気共鳴、蛍光の3つを比較する。いずれも分子の回転運動の測定法で、原理にも共通性があり、得られるパラメーターも形の上ではよく似ている。しかし実際は、得意とする時間領域が違い、プローブの形状も違うので、必ずしも同質の情報を与えない。境界脂質論争では、これら測定法のそれぞれの特徴が、最後にはうまく相補的に働き、いちおう統一描像なるものが得られた。

はじめに 前の歴史・背景で述べたように、境界脂質 (boundary lipid) の存在とその運動状態については、大きな論争があった。異なる測定法が、本来おなじような情報を与えるものと期待されているにもかかわらず、一見まったく正反対の答えを出したりしたのも一因である。

ここでは、境界脂質を例にとって、測定法の比較を試みたい。

境界脂質とバルク脂質を区別したのは運動性の差であった。そこで運動性の代表的な測定法として、電子スピン共鳴 (ESR)、核磁気共鳴 (NMR)、蛍光偏光解消法の3つをとりあげる。これらはいずれも回転運動の測定手段で、原理や与える情報のうえで互いに親戚関係にある。似たものどうしが実はどんなに違うか、そしてどれだけ相補的にふるまい得るかを典型的に示してくれたのが境界脂質論争といってもよいだろう。

以下ではまず、3つの測定法の原理をごく簡単に解説した後、回転運動を記述するパラメーターにもいろいろあること、境界脂質ではそれらがどんな値をとり、そこから最終的にどんな統一描像が得られたかについて述べる。最後に、各測定法の長短を議論する。

I. 回転運動の測定

上に述べた3つの測定法、ESR、NMR、蛍光で得られる信号は、いずれもプローブ分子の空間における向きを反映する。磁気共鳴法 (magnetic resonance spectroscopy) では、磁場の方向とプローブのなす角度により共鳴線の位置が変わる。たとえば ESR では、ニトロキシドスピンプローブ (図 1A) のリング面の法線が磁場となす角に応じて、3本の共鳴線の間隔が変わる (図 2A 左)。炭素原子に結合した重水素 (図 1B) の NMR なら、CD 結合軸の磁場中の向きにより、2本の共鳴線の間隔が変わる (図 2A 右)。一方蛍光は、常にプローブ分子の遷移モーメントの方向に偏光している。膜研究によく使われる DPH という色素 (図 1C) なら、遷移モーメントは色素分子の長軸に平行だから、蛍光の偏光方向から直接長軸の向きがわかる*1。

こうして、試料が結晶とか配向膜のようなものなら、その中でプローブ分子の (平均の) 向き、および向きの揃い具合を知ることができる。溶液や膜の懸濁液のように等方的な試料では、向きそのものの測定に意味はないが、向きの時間変化として回転運動についての情報が

Kazuhiko Kinoshita, Jr., Akira Ikegami, 理化学研究所生物物理研究室 (〒351-01 埼玉県和光市広沢 2-1) [The Institute of Physical and Chemical Research, Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-01, Japan]

Boundary Lipid—Comparison of Different Spectroscopic Techniques

[Key word] 【境界脂質】【回転運動】【磁気共鳴法】【蛍光偏光解消法】

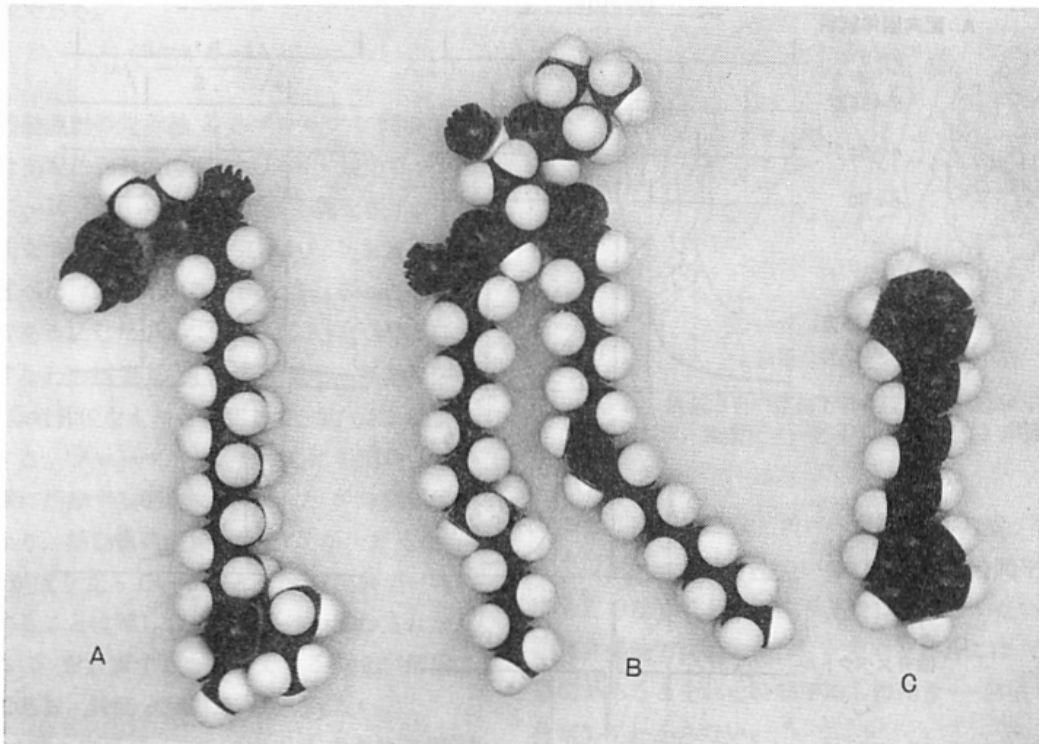


図 1. 脂質の運動性のプローブ

A: 脂肪酸スピララベル剤の一例 (p. 145, 図 1 の 2)。左上のマレイミド基で膜蛋白質の SH 基に結合する。右下のふくらみはニトロキシドの五員環で、リング面は炭化水素鎖に垂直。

B: リン脂質のひとつ, 1-パルミトイル-2-オレオイル-ホスファチジルコリン。特定のメチレン基のみ重水素化したものを合成でき, NMR プローブに用いる。右側のオレイン酸鎖はシス二重結合のところで曲がる。左のパルミチン酸鎖は直鎖が安定だが, ここではゴーシェ結合を 2 つ入れて屈曲性を示した。

C: 代表的な蛍光プローブ, 1,6-ジフェニル-1,3,5-ヘキサトリエン (DPH)。

得られる。

向きが測れる以上, 回転運動が測れるのは当然といえるかもしれない。しかし分子の回転は速いので, 回転の時間経過を直接追えるのはいまのところパルス蛍光偏光解消法 (fluorescence anisotropy decay method; 16-4 参照) だけである。磁気共鳴法や定常光励起蛍光法では, それぞれの手法に固有の時間 τ の間にどれだけ向きが変化するかを以下のようにして間接的に見積もる。

磁気共鳴法の場合, 回転運動が十分遅ければ, プローブのとり得る向きのそれぞれに応じた共鳴線が現れるので, スペクトルは大きく広がる (図 2 B)。運動が速くなると, 平均の向きだけが共鳴に寄与ようになるので, スペクトルの幅は狭くなる (図 2 C)。平均化の条件は, もとのスペクトルの幅に比べて運動が速いことで, この幅は, 図 2 に示すように, ESR で 10^8 Hz, 重水素 NMR で 10^5 Hz 程度である。そこで, τ (ESR) $\sim 10^{-8}$ 秒または τ (重水素 NMR) $\sim 10^{-5}$ 秒以内にどれだけ回転

が起きるかが, スペクトル幅の測定から見積もれることになる (図 2 からわかるように, A_{\parallel} , A_{\perp} , $\Delta\nu_Q$ などがスペクトル幅に連動して変わるので, よい目安となる)。

蛍光偏光解消法では, 偏光した光を照射することにより, 特定の方向を向いたプローブだけを励起する。励起されたプローブが動かなければ, 蛍光はこの方向に偏光しているが, 励起状態の寿命 τ (= 蛍光寿命) の間に回転運動が起きれば, プローブの向きがバラバラになるので, その分偏光度が下がる (p. 240, 図 3 参照)。パルス偏光解消法ではこの偏光度減少過程を時分割測定して回転の時間経過を追跡するが, 簡便な定常光励起法では, τ の間に平均としてどれだけ回転したかだけがわかる。 τ は多くのプローブで 10^{-8} 秒前後で, ESR と同じ時間域の回転運動が測れる。

さて, τ の間にどれだけ回転するか, といった言い方をしたのは訳がある。図 3 は, 時刻 0 でのプローブの向きと時刻 t での向きとの角 ω (つまり回転角) の自

*1 偏光子を通して蛍光を観測するとき, 偏光子の光軸とプローブのなす角が θ なら, 透過光量は $\cos^2\theta$ に比例する。磁気共鳴法では, 磁場とプローブの間の角を θ として, 共鳴線の位置が $\cos^2\theta$ の関数である。両法とも測定量が $\cos^2\theta$ という点で親戚関係にあり, 解析理論にも共通性がある。

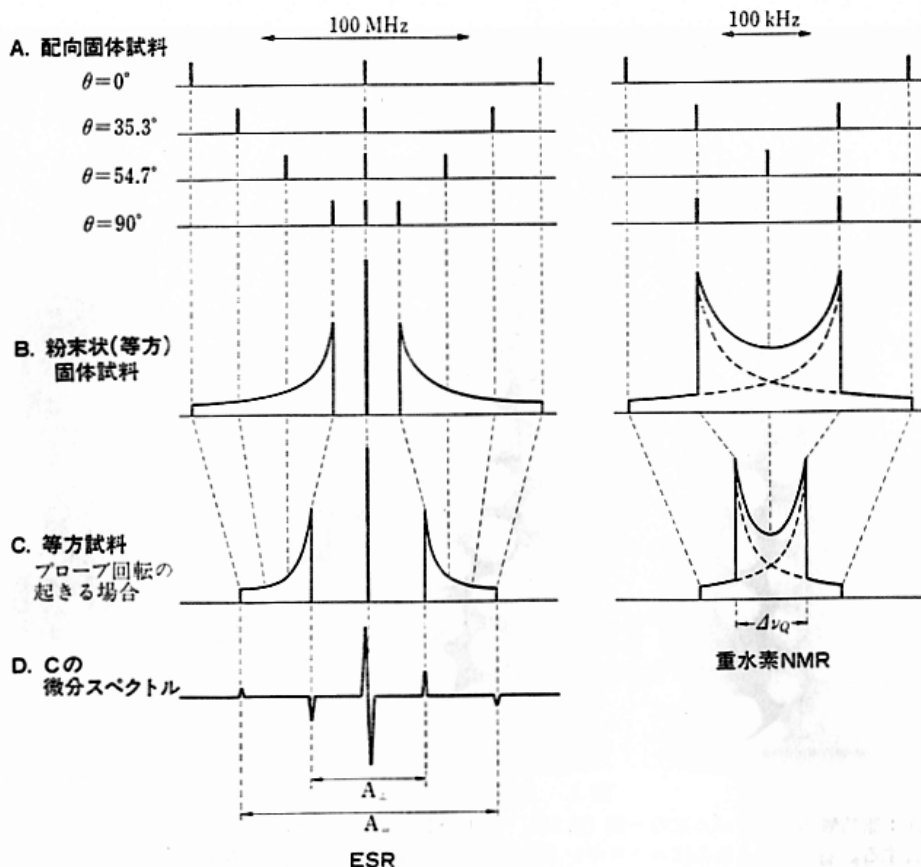


図 2. 磁気共鳴スペクトルの模式図

Aにおいて θ はプローブと磁場のなす角。ここでは簡略化してあるが、ESRの3本の共鳴線は、プローブの向きに応じて間隔が変わるだけでなく、全体として平行移動もするので、B以下のスペクトルも、実際は左右の対称性がくずれ、中央の線も広がる。なお、ESRスペクトルは、ふつうDの微分表示で与えられる。

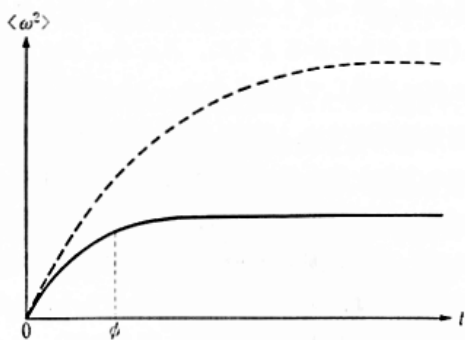


図 3. プローブの回転角 ω の時間変化
 $\langle \omega^2 \rangle$ は試料中の全プローブ分子についての平均。

乗平均を時間に対してプロットしたものである。膜の中など異方的な媒質中では、一般にプローブのとり得る向きが制限されるので、 ω も制限され、実線のようにある時間の後 $\langle \omega^2 \rangle$ に落ち着く。溶液中などの自由回転でも、 ω は180度を超えないので、破線のように結局は一定値に落ち着く。いずれの場合も、最終値 $\langle \omega^2 \rangle$ にほぼ達するまでの時間を ϕ としよう。すると、 $\tau \gg \phi$ ならば、 τ の間に回転した量 $\langle \omega^2 \rangle$ というのは $\langle \omega^2 \rangle$ にほぼ等しい。すなわち、この場合に磁気共鳴や定常光励

起蛍光からわかるのは、回転範囲（プローブの向きがどれくらい制限されているか）で、回転の速さではない。逆に $\tau \ll \phi$ なら、 $\langle \omega^2 \rangle$ は回転の速さに比例する。ただしここで考えているのは回転ブラウン運動だから、速さは回転拡散定数（ $= \lim_{t \rightarrow 0} [\langle \omega^2 \rangle / 4t]$ ）で表され、これが測定量となる。 $\tau \sim \phi$ のときは、測定量は回転の速さと範囲の両方に依存し、分離は難しい。

II. 回転運動（揺動運動）を特徴づけるパラメーター

蛋白質の内部運動や膜中の運動など、構造体の中の回転運動は一般に、回転範囲が制限された揺動運動となる。自由回転なら速さだけで記述できるが、揺動運動の特徴づけにはいくつかのパラメーターが必要である。これまでの説明で大体の感じはわかっていたと思うので、どうやって求めるかは省いて、以下に簡単な定義だけを示す。

(1) オーダーパラメーター (S)

磁気共鳴法でおなじみのオーダーパラメーター S は、

次のような量である。

$$S = \left\langle \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right\rangle_{\tau} \quad (1)$$

ここで β は揺動運動の対称軸 Z とプローブの間の角度で、 $\langle \rangle_{\tau}$ は測定法固有の時間 τ (ESR・蛍光で $\sim 10^{-8}$ 秒, NMR で $\sim 10^{-5}$ 秒) にわたっての平均を表す。

いくつか注をつけよう。まず、実験から S を求めるのは、I 節で述べた $\tau \gg \phi$ の条件が満たされることが期待される場合である。したがって S は図3の $\langle \omega^2 \rangle_{\tau}$ に対応する量、すなわち揺動範囲を表す量で、揺動範囲が(近似的に)軸対称性をもつと仮定して、式(1)のように β で定義する。プローブが Z を中心に半頂角 β_0 の円錐内を一樣に揺動する場合には、 β_0 と S の関係は図4のようになり、揺動範囲が狭いほど S が大きくなる。なお、 $\tau \gg \phi$ が成り立っているかどうかを実験データから直接判定することは難しく、この条件が満たされなくても形式的に S を計算することはできるので、解釈に注意が必要である。時間分解測定なら問題ない。

対称軸 Z は個々のプローブについての向きの時間平均と考えてよいので、プローブごとに異なり得る。実際、膜中の S を求めるときは、ふつう懸濁液—あらゆる方向を向いた膜の集合—で測定を行なう。図5の例のように、 Z はとなりのプローブ分子との間でさえ異なるとよい。さらに、同一のプローブ分子が ϕ_1, ϕ_2 ($\phi_1 \ll \phi_2$) で特徴づけられる2種の運動をするときは、 Z は(もちろん S の値も) τ に依存する(後述)。

(2) 配向度 (P)

膜試料なら、配向膜を用いれば平面膜内でのプローブ分子の向きの揃い具合を測定できる。

$$P = \left\langle \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right\rangle \quad (2)$$

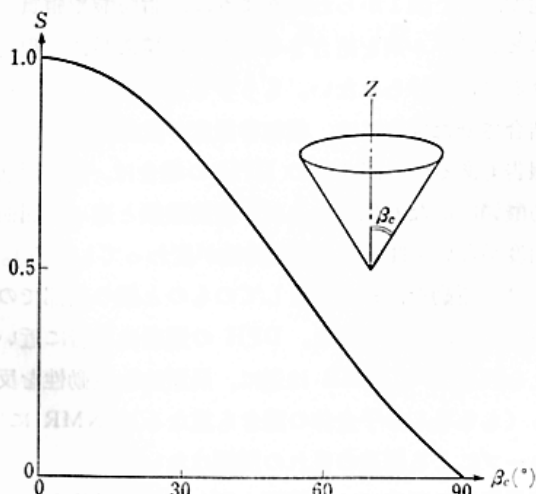


図4. オーダーパラメーター S と円錐角 β_0 の関係

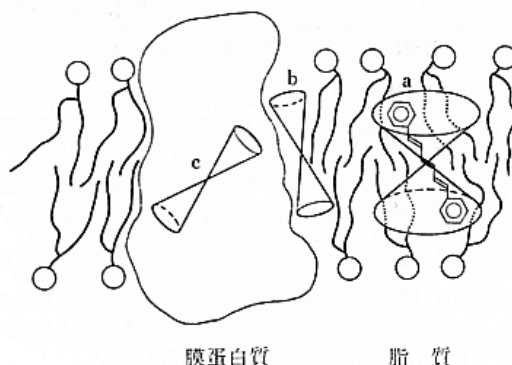


図5. 膜蛋白質の存在下での脂質脂肪酸鎖の運動
aの中には、蛍光プローブ DPH (図1C) が描かれている。

ここで θ は膜の法線とプローブの間の角度、 $\langle \rangle$ はすべてのプローブ分子についての平均で、時間平均はとつてもとらなくても定義のうえでは変わりがない。ただし磁気共鳴法で実験的に P を求める場合には、速い揺動運動があるとそれを時間平均した向き—前項の Z —の分布しかわからない。

$$P' = \left\langle \frac{3 \cos^2 \theta' - 1}{2} \right\rangle \quad (3)$$

ここで θ' は膜の法線と Z の間の角度である。 P と P' の間には

$$P = S \cdot P' \quad (4)$$

の関係が成り立つとして(大体)よいから、懸濁液系で S を測って P' と合わせれば、 P が求まる。式(4)からもわかるように、一般に $P \leq S$ となる。

前項のオーダーパラメーターの“order”は、本来式(2)の定義がふさわしい量である。均一な膜や液晶なら $P'=1$ 、すなわちすべてのプローブの Z が互いに平行と仮定してもおかしくないので、 S を測って P の代わりにできる。磁気共鳴法で S をオーダーパラメーターと名付けたのはこのような事情によるのだろう。

(3) 回転拡散定数 (D)

すでに述べたように、速さを記述するのは回転拡散定数 D で、単位は rad^2/s となる。図3の曲線の初期勾配の $1/4$ がちょうど D である。磁気共鳴法や定常光励起蛍光法では、 $\tau \ll \phi$ または S の値があらかじめわかっているとき、 D が求まる。

D は、アインシュタインの関係式

$$D = kT/6\eta V \quad (5)$$

を満たす。 k はボルツマン定数、 T は絶対温度、 V はプローブの実効体積、 η は揺動に対する実効粘度で、 V がわかっているれば膜の“粘度”がわかることになる。

表 1. 境界脂質とバルク脂質の運動性の違い

ESR	$S_{\text{境界}} > S_{\text{バルク}}^{21)*1}$	$P'_{\text{境界}} \sim 0 < P'_{\text{バルク}}^{22)}$	$\phi_{\text{ex}} > 5 \times 10^{-8}$ 秒 ¹⁰⁾
NMR	$S_{\text{境界+バルク}} < S_{\text{バルク}}^{18,19)}$	$\phi_{\text{境界}} \sim \phi_{\text{バルク}}^{20)*2}$	$\phi_{\text{ex}} < 10^{-4}$ 秒 ^{10,19)}
時分割蛍光	$S_{\text{境界}} > S_{\text{バルク}}^{23)}$	$D_{\text{境界}} \sim D_{\text{バルク}} (\phi_{\text{境界}} < \phi_{\text{バルク}})^{23)}$	

- *1 境界脂質に関しては $\tau \gg \phi$ の保証がなかったし、運動性も非常に低かったので、ESR の測定結果はオーダーパラメーター S では表されず、たんに "immobilized" と報告された。 S を τ の間の揺動範囲と解釈すれば、 $S_{\text{境界}} \sim 1$ で、この表のようになる。
- *2 スピン-格子緩和時間の測定から得られた。この ϕ の値、約 2×10^{-10} 秒は蛍光で得られた ϕ に近く、脂肪酸鎖の局所的な揺動を表すものと考えられる (境界脂質とバルク脂質の交換時間からの寄与は無視でき、したがって対応する S は ESR ないし蛍光のものに近いはずである)。

(4) 揺動の緩和時間 (ϕ)

プローブの向きが、許された角度範囲 ((1) の S に対応) 程度変化するのにかかる時間 ϕ として定義できる。図3の ϕ のことと思ってよい。 ϕ は $1/D$ に比例するだけでなく、 S にも依存し、同じ D に対し S が大きいほど ϕ は小さくなる。 S が大きいことは、図3で $\langle \omega^2 \rangle_0$ が小さいことと同じだから、上の関係は自明だろう。 ϕ を求めるには、あらかじめ対応する S の値がわかっている限り、時間分解測定が必要である。

(5) 境界脂質とバルク脂質の交換時間 (ϕ_{ex})

これは境界脂質の問題に特有のパラメーターで、 ϕ_{ex} と表すことにしよう。 ϕ という記号を用いたのは、実験上は回転の速さを特徴づける量として求まるからである。すぐあとに説明する統一描像が正しければ、両脂質の交換は向きの変化を伴う。

III. 境界脂質の運動性

上に述べた諸パラメーターが、境界脂質とバルク脂質でどのように違うかを、表1にまとめた。図5のように考えれば、これらの結果すべてを、いちおう統一的に説明できる。

まず、ESR・蛍光の得意なナノ秒領域の話から始めよう。図中の3組の円錐は、この時間域での揺動範囲を示すもので、 a はバルク脂質、 b と c は境界脂質を表す。境界脂質の揺動範囲は狭いので、 S は大きい。しかし時間平均した向き Z は、蛋白質表面の位置により大きく異なり、したがって P' は低い。両脂質とも D は大きく 10^8 rad²/s 程度 (20 度向きを変えるのに約1ナノ秒) で、 S が大きい分だけ境界脂質の ϕ が少し短い。いずれにしても ϕ は 10^{-9} 秒程度で、 $\tau \gg \phi$ はほぼ成り立つ。

マイクロ秒領域になると、両脂質の交換が起きる。すると、境界脂質のナノ秒域での Z がバラバラなおかげで、境界脂質からみてもバルク脂質からみても、とり得

る向きの範囲が広がる (すべての円錐が足し合わされて、膜に垂直な Z をもつ広い円錐になる)。 τ がマイクロ秒域にある NMR の S はこの広がった範囲に対応するので、膜蛋白質が存在すると脂質だけの膜に比べて S が下がる。結局、ナノ秒域の速い揺動と、マイクロ秒域の交換に伴うゆっくりした向きの変化の、2種類の回転運動が存在することで表1が説明できる。

IV. 各測定法の得手不得手

上に述べた "統一描像" は、各測定法がそれぞれの守備範囲のなかで出した結果を、大きな矛盾なしに説明できるようつなげたものである。しかし守備範囲どうしの重なりはあまり大きくないので、"証明された" わけではない (表1に細かい数字を入れて議論しなかったのは、このせいもある)。守備範囲のなかでも、安心してまかせられるところとカバーの必要なところがありそうで、その辺をもう少し議論しよう。まずはプローブの違いから。

表1に示した運動性は、あくまで各プローブの運動性で、どれだけ忠実に脂質分子の動きを反映しているかは問題である。図1からわかるように、脂肪酸や脂質分子にスピラベル剤を結合させると、膜構造がある程度乱されるのは避けられない。もう少し大きい蛍光プローブを結合させた場合には、相転移温度が数度変わったという報告もある²⁴⁾。図1CのDPHの場合は、その形状が脂肪酸鎖にかなり似ているが、脂肪酸鎖と違って屈曲の自由度がない (曲がると蛍光特性が変わってしまう)。脂肪酸鎖の運動を、鎖全体としてのものと鎖の内部での相対運動に分けるとすると、DPHの運動は前者に近いと考えられる^{5,22)}。NMRは逆に、局所的な運動性を反映する (もちろん分子全体の動きも重なる)。NMRには、プローブによる構造の乱れの問題はない。

境界脂質の研究では、膜蛋白質と脂質の量比を変えて再構成した膜からの信号を比べることが多い。脂質量を

減らしたときに正しく膜ができているか（これは測定法によらず問題である）、前稿(11-1 A)で述べたように単に“trapped lipid”をこしらえているのではないか、など批判もでてくる。これを避けるのに、図1Aのような蛋白質への結合基をもつプローブが使われたが、こちらはこちらで、蛋白質側の反応基がうまい位置にないと期待どおり“境界域”に入らない可能性がある。

時間領域の違いについては、すでに述べた。ある実験で測っているのがいったいどんな運動なのかは、実は運動の時間域(D または ϕ)から推定するので、解釈には常に τ を意識する必要がある。とくにNMRのオーダーパラメーター S は、 $\tau \sim 10^{-5}$ 秒より速いすべての運動の結果である(速さの違う運動モードが共存すると、もっと遅い運動まで平均され得る)。分子内の屈曲、分子全体の揺動、境界とバルクの交換、場合によってはさらに膜全体の変形や回転、などのうちどれがどのくらい寄与しているのか、データだけから判断することは難しい。

最後に、磁気共鳴法と蛍光法の相補性について触れよう。蛍光法の大きな特徴は、時間分解測定が可能なところにある。図3の曲線に相当するものをそのまま測れるので、 D (または ϕ)と S を独立に見積もれる。 τ と ϕ の大きさの関係も仮定する必要がない(ただし、運動が遅すぎて $\phi > \tau$ になると D しかわからない)。一方磁気共鳴法の強みは、スペクトルの分解能がよいことで、試料中に運動状態の異なるプローブが混在するとき、それらを別々の信号としてとらえられる(蛍光では両者の運動状態の平均しかわからない)。ESRによる境界脂質の研究では、この特徴がよくいかされた。時間軸は蛍光、“成分”軸が磁気共鳴法の、第一の受け持ちといっていよう。

各測定法とも、新しい技術・プローブの開発によりその守備範囲を広げつつあり、遠からず統一描像が証明される日がくるかもしれない。

おわりに 境界脂質の話くらい、いろいろな測定法がそれぞれの持ち味を十分発揮して、互いによく補いあった例は、あまりない。などとは、いちおうの合意が得られたあとだから言えることで、迂余曲折があったのは前稿に書かれているとおりでである。

“測定法が違えば結果が違うのはあたり前だ”，ですまされてしまうことも多いなかで、ともかく合意に達したのは、多くの研究者の統一描像をめざしての協力による。専門が異なり、あるいは意見の対立している研究者どうしが、それぞれの特徴と限界をよく認識したうえで、討論や共同実験を重ねたおかげだろう。研究者の間の境界をいかにのりこえるかを教えてくれたのが、境界脂質の一番大きな意義かもしれない。

文 献

- 文献番号 21 までは、前稿(11-1 A)を参照されたい。
- 22) Jost, P., et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **311**, 141-152 (1973)
 - 23) Kinoshita, K., Jr., et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **647**, 7-17 (1981)
 - 24) Cadenhead, D. A., et al.: *Biochemistry.*, **16**, 5386-5392 (1977)
 - 25) Petersen, N. O., Chan, S. I.: *Biochemistry.*, **16**, 2657-2667 (1977)
 - 26) Jähnig, F. et al.: *Biochemistry.*, **21**, 6790-6798 (1982)
- なお、各測定法についての解説としては、本誌第4部および11-3節のほか、たとえば次のようなものがある。
- 27) Schreier, S., et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **515**, 375-436 (1978)——ESR
 - 28) Seelig, J.: *Q. Rev. Biophys.*, **10**, 353-418 (1977)——重水素 NMR
 - 29) Kinoshita, K. Jr., et al.: *Adv. Biophys.*, **17**, 147-203 (1984)——蛍光

