

低い pH が誘起する生体脂質膜の 2 分子膜液晶相から双連続キュービック相への相転移の活性化エネルギー

Activation Energy of the Low pH-Induced Lamellar to Bicontinuous Cubic Phase Transition in Biological Lipid Membranes

岡俊彦^{1,2}, 齋木貴洋², Jahangir Md. Alam¹, 山崎昌一^{1,2,*}

¹静岡大学 電子工学研究所, ²静岡大学 理学研究科, 〒422-8529 静岡市駿河区大谷 836

Toshihiko Oka^{1,2}, Takahiro Saiki², Jahangir Md. Alam¹, and Masahito Yamazaki^{1,2,*}

¹Research Institute of Electronics, ²Dept. Phys., Grad. Sci., Shizuoka University, 836 Oya, Suruga-ku, Shizuoka, 422-8529, Japan

1 はじめに

生体膜や脂質膜の双連続キュービック相 (Q_{II} 相) は 3 次的に規則的につながった膜である。 Q_{II} 相の構造を持つ膜は生体中でも見出されており、条件が変われば 2 分子膜の液晶相 (L_{α} 相) に転換する例も知られている。 Q_{II} 相と L_{α} 相の相転移は生体膜のトポロジー変化では重要な膜の構造変化であるが、相転移を引き起こす因子やその反応機構について未解明な点が多い。我々は、膜の表面電荷 (負電荷を持つ脂質の膜内濃度、または膜界面に結合する荷電ペプチド濃度で制御) による静電相互作用 (EI) の変化により異なる Q_{II} 相間の相転移や Q_{II} 相と L_{α} 相の多重層リポソーム (MLV) の間の相転移が誘起されることを発見し、系統的な研究を行ってきた [1]。

我々は、水溶液の pH を下げることにより、ジオレオイルホスファチジルセリン (DOPS) とモノオレイン (MO) の混合膜の L_{α} 相が Q_{II}^D 相に相転移することを発見した [2]。pH が減少すると DOPS のプロトン化が起こり膜の表面電荷密度が減少するので、この相転移も上記の EI による相転移である。DOPS や MO は細胞中の生体膜でも重要な脂質であり、pH 変化は細胞中で生理的な役割を果たしているため、この膜系での研究は生理的に重要である。EI による Q_{II} 相と L_{α} 相の相転移のキネティクスを研究するための最良の研究対象はこの低い pH が誘起する L_{α} 相から Q_{II}^D 相の相転移と考えられるので、ストップフローと放射光を組み合わせた時分割 X 線小角散乱法 (TR-SAXS) を用いてこの相転移の研究を行った [3,4]。MLV の場合は、低い pH にしてから 1 分以内に L_{α} 相がヘキサゴナル II (H_{II}) 相に転移し、その後ゆっくり H_{II} 相が Q_{II}^D 相に転移した (図 1 参照)。

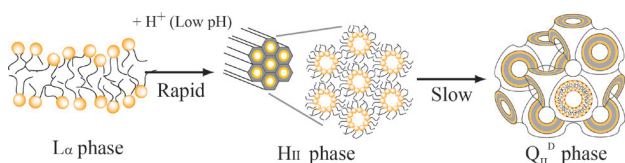


図 1 : 低い pH が誘起する L_{α} 相から Q_{II}^D 相の相転移のキネティクスパスウェイ

それぞれの転移の速度定数を求め、初期過程 (L_{α} 相から H_{II} 相への転移) の速度定数は pH が高くなるにつれて小さくなることを見出した。これは EI の変化による L_{α} 相と Q_{II} 相の間の相転移のキネティクスの最初の実験結果である。

本研究では、低い pH が誘起する DOPS/MO (2/8) 膜の L_{α} 相から Q_{II}^D 相への相転移の温度依存性を調べ、それを解析することによりそれぞれの素過程の活性化エネルギーを求めることを目的とした

2 結果および考察

まず、種々の pH の緩衝液 (100 mM NaCl を含む) 中にある DOPS/MO (2/8) 膜の温度を 20 °C から 50 °C まで 1 K/min の速度で上昇させ、その間の構造変化を PILATUS3 検出器を用いて測定した (Photon Factory BL6A)。図 2A は pH 2.7 の結果を示す。35.0 °C で Q_{II}^D 相から H_{II} 相に相転移が起こった。相転移が起こる温度は pH が増加するにつれて、少し増大

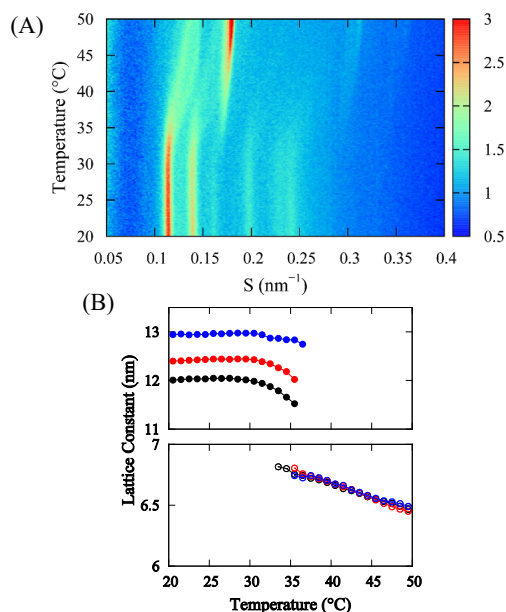


図 2 : DOPS/MO (2/8) 膜の 20 °C から 50 °C までの温度変化に伴う相と構造の変化

した (図 2B、pH 2.6 (黒)、pH 2.7 (赤)、pH 2.8 (青))。 Q_{II}^D 相の格子定数は 20–31 °C では一定だったが、相転移が起こる少し前の温度から減少した。一方、 H_{II} 相の格子定数は温度とともに減少した。

次に、中性の DOPS/MO (2/8)-MLV と低い pH の緩衝液をストップフローにより急速混合し、低い pH にジャンプさせたときの相と構造の時間変化を TR-SAXS を用いて種々の温度で調べた (SPring-8, BL40B2)。図 3A は最終 pH が 2.6 で温度が 20 °C のときの結果を表す。混合後 10 s までは L_{α} 相の SAXS ピークのみが観測されたが、10 s 後から H_{II} 相のピークが現れ始め、その強度は 50 s までは時間とともに増大し、その後減少した。100 s から Q_{II}^D 相のピークが現れ始め、時間とともに増大した一方、図 3B は最終 pH が 2.6 で温度が 30 °C のときの結果を表す。20 °C のときと比べると、 H_{II} 相のピークはより早く現れ始め、 Q_{II}^D 相のピークは少し遅く現れ始めることがわかった。これらの結果は、上記の温度では、低い pH にジャンプしてからまず L_{α} 相が H_{II} 相に急速に転移し、その後ゆっくり H_{II} 相が Q_{II}^D 相に転移することを示している。最終 pH が 2.7 や 2.8 でも実験を行い、定性的には同様の結果を得た。

素過程の速度定数を定量的に比較するために、初期過程 (L_{α} 相から H_{II} 相への転移) と 2 番目の過程 (H_{II} 相から Q_{II}^D 相への転移) の速度定数を NMF 法 (非負値行列因子分解法) により求めた。図 4 はその温度変化を示す。初期過程の速度定数は温度とともに大きく増大し、その温度変化の解析から見かけの活性化エネルギーを導出した (図 4A)。一方、2 番目の過程の速度定数は、pH 2.7 と 2.8 では温度

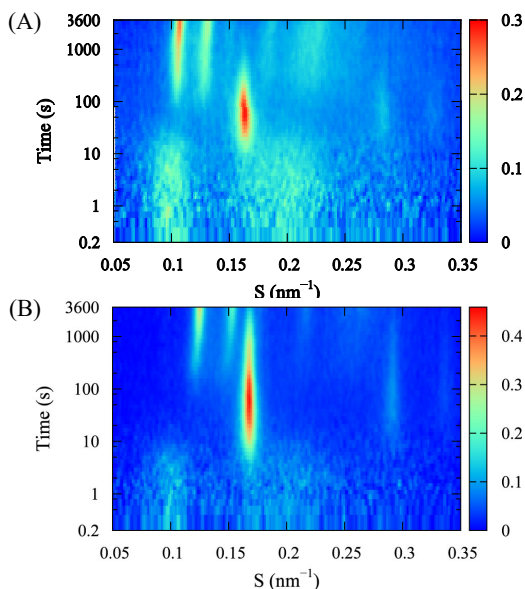


図 3 : DOPS/MO (2/8) 膜を pH 6.7 から 2.6 にジャンプさせたときの相や構造の時間変化。(A) 20 °C、(B) 30 °C。

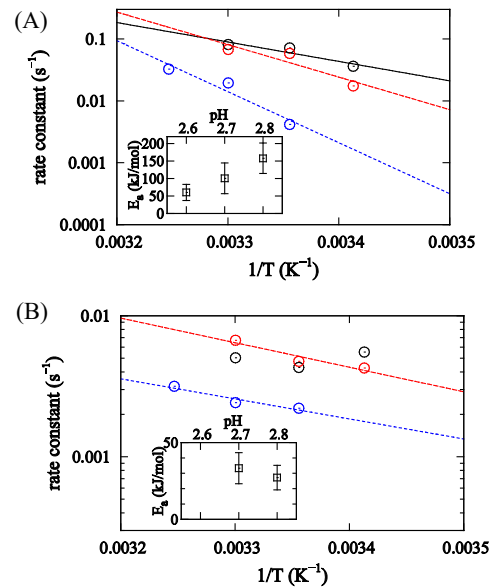


図 4 : 速度定数の温度依存性。(A)は初期過程、(B)は 2 番目の過程。pH 2.6 (黒)、pH 2.7 (赤)、pH 2.8 (青)。

とともに少し増加したが、pH 2.6 ではわずかに減少した (図 4B)。pH 2.7 と 2.8 の 2 番目の過程の見かけの活性化エネルギーは、初期過程のそれよりも小さかった。活性化状態の自由エネルギーが温度依存的に変化する場合の相転移の理論 [6] を改良した理論を構築して図 4 の結果を解析し、その理論により結果を定性的には説明できることを明らかにした。

図 2 で温度変化により出現する H_{II} 相の格子定数 (35 °C で 6.8 nm) は、低い pH にジャンプさせたときに中間体として現れる相の格子定数と一致した。このことは、中間体が H_{II} 相であることを支持する。

3 まとめ

低い pH が誘起する DOPS/MO (2/8) 膜の L_{α} 相から Q_{II}^D 相への相転移の 2 つの素過程の活性化エネルギーの値や情報を得ることに成功した。これらの結果はこの相転移のメカニズムの解明に寄与する。

謝辞

図 2、3、4 は文献 [5] よりアメリカ化学会の許可を得て転載した。

参考文献

- [1] M. Yamazaki, *Adv. Planar Lipid Bilayers Liposomes*, **9**, 163, (2009)
- [2] Y. Okamoto *et al.*, *Langmuir*, **24**, 3400, (2008)
- [3] M. M. Alam *et al.* *J. Chem. Phys.* **134**, 145102 (2011)
- [4] T. Oka *et al.*, *Langmuir*, **30**, 8131 (2014)
- [5] T. Oka *et al.*, *Langmuir*, **32**, 1327 (2016)
- [6] A. M. Squires *et al.*, *Soft Matter*, **5**, 4773 (2009)

* yamazaki.masahito@shizuoka.ac.jp