

低い pH が誘起する生体脂質膜の 2 分子膜液晶相から  
双連続単純キュービック相への相転移

Low-pH-Induced Lamellar to Bicontinuous Primitive Cubic Phase Transition in  
Biomembranes

岡俊彦<sup>1,2</sup>, Moynul Hasan<sup>3</sup>, Md. Zahidul Islam<sup>3</sup>, Md. Moniruzzaman<sup>3</sup>, 山崎昌一<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>静岡大学 電子工学研究所, <sup>2</sup>静岡大学 理学研究科, <sup>3</sup>静岡大学創造科学技術大学院  
〒422-8529 静岡市駿河区大谷 836

Toshihiko Oka<sup>1,2</sup>, Moynul Hasan<sup>3</sup>, Md. Zahidul Islam<sup>3</sup>, Md. Moniruzzaman<sup>3</sup>, Masahito Yamazaki<sup>1-3,\*</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Electronics, <sup>2</sup>Dept. Phys., Grad. Sci., <sup>3</sup>Integrated Bioscience, Grad. Sci. and  
Tech., 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 次元的に規則的につながった 1 枚の膜であり、その膜面は極小曲面を形成する。 $Q_{II}$  相の構造を持つ膜は生体中에서도見出されており、条件が変われば 2 分子膜の液晶相 ( $L_{\alpha}$  相) に転換する例も知られている。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  $L_{\alpha}$  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]。たとえば、100 mM NaCl を含む緩衝液中で 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  $L_{\alpha}$  相が  $Q_{II}^D$  相に相転移するが、これは EI による相転移の一例である [2]。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。

この低い pH が誘起する  $L_{\alpha}$  相から  $Q_{II}^D$  相の相転移のキネティックスの研究のために、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]。100 mM NaCl 存在下では、低い pH にしてから 1 分以内に DOPS/MO (2/8) 膜は  $L_{\alpha}$  相からヘキサゴナル 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。それぞれの転移の速度定数を求め、初期過程 ( $L_{\alpha}$  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  $L_{\alpha}$  相と  $Q_{II}$  相の間の相転移のキネティックスの最初の実験結果である。さらに、この相転移の温度依存性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に成功した [5]。

水溶液中の静電相互作用は水溶液中のイオン強度に大きく依存する。本研究では、低イオン強度における DOPS/MO (2/8) 膜の低い pH による相転移やそ

のキネティックスを研究し、高イオン強度下の相転移の結果と比較考察した [6]。

### 2 結果および考察

まず 50 mM NaCl を含む緩衝液中の DOPS/MO (2/8) 膜の構造の pH 依存性を SAXS を用いて調べた。中性では膜は  $L_{\alpha}$  相であったが (図 1a)、その中性の膜の懸濁液に低い pH の緩衝液を加えると、最終 pH が 2.75 以下では膜は双連続単純キュービック相 ( $Q_{II}^P$  相) (図 1b) に相転移した (図 1c)。低い pH でも塩濃度が高いときは別のキュービック相 ( $Q_{II}^D$  相) が安定であった。たとえば、pH 2.6 の時は 75 mM NaCl 以上 (100 mM 以下) で  $Q_{II}^D$  相が安定であった。

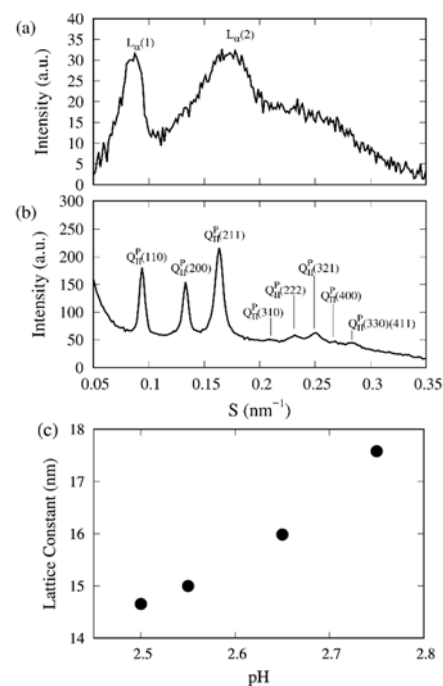


図 1 : DOPS/MO (2/8) 膜の構造の pH 依存性。(a) pH 6.7 (b) pH 2.55 の SAXS パターン。(c)  $Q_{II}^P$  相の格子定数の pH 依存性。50 mM NaCl 存在下。

種々の pH の緩衝液にある DOPS/MO (2/8) 膜の温度を 25 °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 2 は pH 2.55 の結果を示す。32 °C で  $Q_{II}^P$  相から  $H_{II}$  相に相転移が起こったが、50 °C においても  $Q_{II}^P$  は少し共存した。 $Q_{II}^P$  相の格子定数は 29 °C まではほぼ一定で、それ以上の温度から減少したが、 $H_{II}$  相の格子定数は温度とともに減少した。pH 2.65 においても、ほぼ同様の温度依存性の結果を得た。

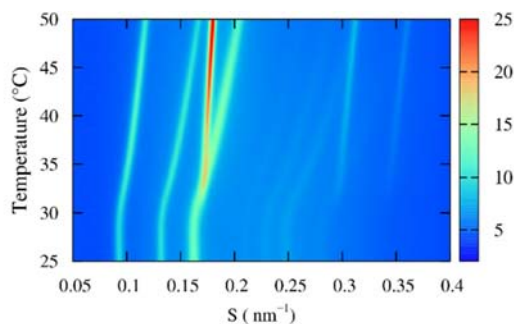


図 2 : DOPS/MO (2/8) 膜の 25 ~50 °C の温度変化に伴う相と構造の変化。pH 2.55。50 mM NaCl 存在下。

次に、図 1 の低い pH が誘起する  $L_\alpha$  相から  $Q_{II}^P$  相の相転移のキネティックスパスウェイを解明するために、TR-SAXS を用いて研究した (SPring-8, BL40B2)。50 mM NaCl を含む緩衝液中で中性の 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 により

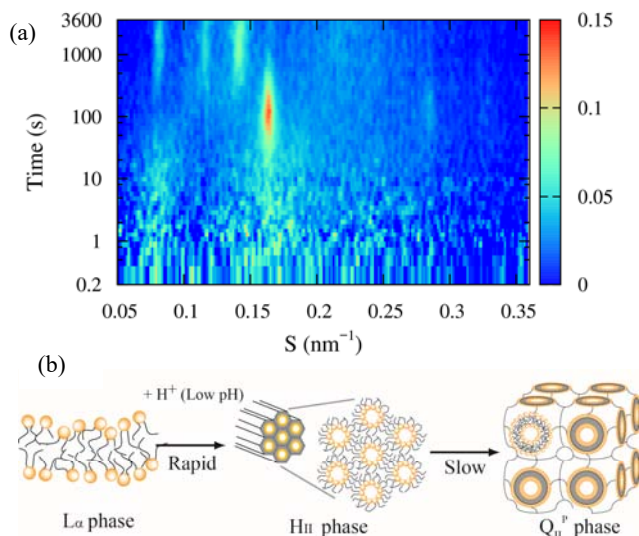


図 3 : 低イオン強度下の低い pH による DOPS/MO (2/8) 膜の  $L_\alpha$  相から  $Q_{II}^P$  相への相転移のキネティックスパスウェイ。(A) pH 6.7 から 2.65 にジャンプさせたときの SAXS パターンの時間変化。50 mM NaCl 存在下。(B) この相転移のキネティックスパスウェイの模式図。

モニターした。図 3a は最終 pH が 2.65 で 25 °C のときの結果を表す。混合後の初期は  $L_\alpha$  相の SAXS ピークのみが観測されたが、混合後 20 s 後から  $H_{II}$  相のピークが現れ始め、その強度は 100 s までは時間とともに増大し、その後減少した。200 s から  $Q_{II}^P$  相のピークが現れ始め、時間とともに増大した。この結果は、50 mM NaCl を含む緩衝液中の DOPS/MO (2/8) 膜の低い pH が誘起する相転移では、まず最初の過程で  $L_\alpha$  相から  $H_{II}$  相への転移が急速に起こり、その後の過程で  $H_{II}$  相から  $Q_{II}^P$  相へのゆるやかな転移が起こることを示している (図 3b)。

素過程の速度定数を定量的に比較するために、初期過程 ( $L_\alpha$  相から  $H_{II}$  相への転移) と 2 番目の過程 ( $H_{II}$  相から  $Q_{II}^P$  相への転移) の速度定数を、SAXS のそれぞれの相のピーク強度の時間変化を NMF 法 (非負値行列因子分解法) により解析することにより求めた。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温度とともに減少した (図 4b)。以上の結果を、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理論により解析し、定性的には実験結果を説明できることを明らかにした。

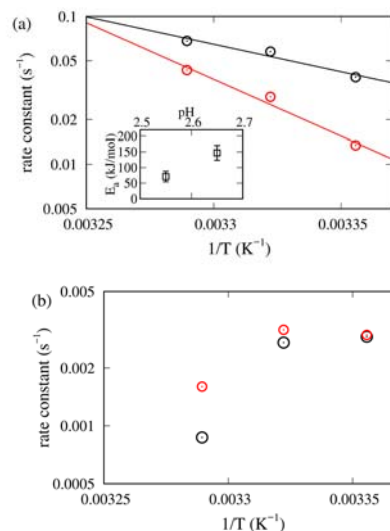


図 4 : 相転移の速度定数の温度依存性。(A) は初期過程、(B) は 2 番目の過程。pH 2.55 (黒)、pH 2.65 (赤)。

謝辞 図 1-4 は文献 [6] 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] T. Oka *et al.*, *Langmuir*, **33**, 12487 (2017)  
 \* yamazaki.masahito@shizuoka.ac.jp