

# 脂質膜間相互作用におけるホフマイスター効果 Hofmeister effect on interaction between lipid membranes

菱田真史\*

筑波大学数理物質系化学域, 〒305-8571 つくば市天王台 1-1-1

Mafumi Hishida\*

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

## 1 はじめに

高分子や界面活性剤、生体分子といったソフトマターは静電相互作用や van der Waals 相互作用といった相互作用によって自己組織化し、様々な構造を作ることが知られている。これらの相互作用は共有結合などに比べて格段に弱く、外的な要因によってそのバランスは大きく変化し、その結果自己組織化構造も大きく変わる。そのことをうまく利用し、ソフトマターは各種工業製品に利用されており、また、生命の維持にも大きな役割を持っている。

ソフトマターの一つであるリン脂質二重膜は生体膜の基本構造でもあるため、生体膜の物性を物理的に理解するために盛んに研究されてきた。膜の間にも様々な“弱い”相互作用が働き、そのバランスによって膜が集まったラメラ構造は様々に変化する。とくに電気的に中性の膜の場合、van der Waals 相互作用、膜のゆらぎに起因した立体斥力相互作用、ごく近距離にのみ働く斥力（起源は諸説有り）が働くとこれまで考えられてきた。この議論の中では周囲の水は均一なものとして仮定され、たとえば水和水といった水の不均一性の影響というのは無視されてきた。

しかし中性の界面活性剤のミセルの場合、この水の不均一性がミセル間の相互作用に大きく関わっているのではないかと考えられている。たとえば温度上昇に伴うミセルの凝集（曇点現象）では、温度上昇と共にミセル表面の水和水が脱水和し、その結果ミセル間の van der Waals 相互作用が支配的となって凝集するのではないかとされている。

つまりこのことを考えると、リン脂質二重膜間の相互作用にも水和水の影響がある可能性が考えられる。実際に我々が最近、テラヘルツ分光法をもちいてリン脂質二重膜表面の水和状態を観測したところ、リン脂質膜表面には 1 nm と、これまで考えられていたのに比べてかなり長距離に渡る水和層が存在することが分かった[1-3]。この距離は他の相互作用が働く距離と同等であるため、やはり水和水という特殊な水が膜間相互作用に影響している可能性を強く示唆している。

一方で、水中に塩を添加すると塩によって水の水素結合ネットワークが乱されるために、中性の

ソフトマター溶液に塩を添加すると水素結合ネットワークの乱れによってソフトマターの水和状態にも変化が生じると期待される。この効果は一般にホフマイスター効果と呼ばれている。またイオン半径等の影響でイオンの種類によってこの効果の大きさが変化することも知られている。もしも中性脂質膜の膜間相互作用が塩の添加によって変化すれば、さらに塩の種類に依存していれば、水和水状態が相互作用に関わっている間接的な証拠となると期待できる。

そこで本研究では中性のリン脂質膜溶液に塩を添加した際に膜間相互作用がどう影響を受けるのかを明らかにするべく実験を行った。

## 2 実験

脂質は中性の脂質 POPC と POPE を用いた。この二つは疎水部の化学構造は同じ一方で、親水基頭部の構造が異なるリン脂質であり、我々の過去の研究からその水和水状態は大きく異なることが分かっている。そこでそれぞれの脂質溶液に六種類の一価塩（カチオン：Li, Na, K、アニオン：Cl, Br）を添加して、脂質が作るラメラ中での膜間距離が塩濃度にどのように依存するのかを測定した。またサンプルは、十分に過剰水が存在し、膜間相互作用のみによって膜間距離が決まるような条件で調整を行った。

ラメラ中の膜間距離は X 線小角散乱を用いて測定した。X 線小角散乱は Photon Factory BL6A で行った。カメラ長は約 1 m で X 線の波長は 1.5 Å、検出器は PILATUS 300K (Dectris 社製) を用いた。試料の温度制御はメトラート社製の FP900 温度制御システムを X 線散乱用に改良したものを用いた。測定は POPC、POPE とともに液晶相をとる 50 °C で行った。

さらに塩による他の相互作用の変化を見積もるために、膜の表面電位 ( $\zeta$  電位) を測定した。顕微鏡タイプの  $\zeta$  電位計 (Zeecom3000、マイクロテックニチオン社製) を用いて 100 mM の塩を添加した POPC と POPE のサンプルの測定を行った。測定は室温で行った。

### 3 結果および考察[4]

図 1 に X 線小角散乱により求めた POPC および POPE の膜間距離の塩濃度依存性を示す。二つの脂質においてまったく異なる塩濃度およびイオン種依存性を示していることがわかる。POPC の場合、カチオンに Li を持つ塩を添加したときには膜間距離は塩濃度の増加とともに減少しているが、その他の塩では増加している。また、いずれのカチオンの場合でもアニオンが Cl のものよりも Br のもののほうが変化の大きさが大きいということが分かった。一方で POPE の場合、POPC で見られた様な大きなカチオン依存性は見られなかった。またアニオン依存性は POPC の場合と反対に、Cl を持つ塩を添加した場合のほうが膜間距離の変化が大きいという結果になった。

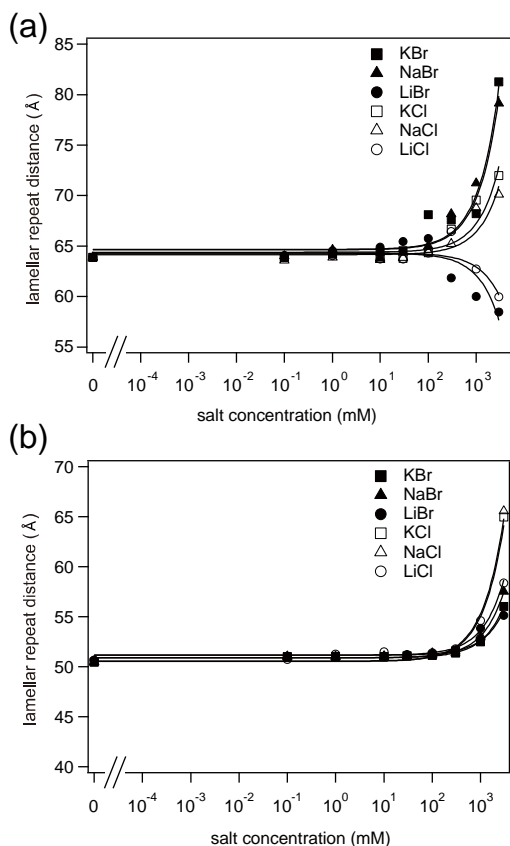


図 1：各種塩の添加に伴うリン脂質二重膜ラメラの膜間距離の変化。(a) POPC、(b) POPE

サンプル中には十分に過剰水が存在しているので、膜間の距離は膜間に働く相互作用によって決まる。しかし実際に膜間相互作用によって決まるのは図 1 で測定した膜間距離（膜厚+水層の厚み）ではなく、水層の厚みのみである。塩によって膜厚が変わる可能性を考慮し、Luzzati らの手法 [5]を用いて、膜間距離が大きく変化した塩濃度 3 M のときの膜厚の変化を見積もった。その結果、膜厚の変化は最大でも 5 Å 程度であり、図 1 で求

めた膜間距離の変化に比べて小さかった。さらに膜間距離から膜厚を引いて水層の厚みを計算したところ、図 2 に示すとおり、その塩の種類に対する依存性は膜間距離のそれとほぼ同じようになった。

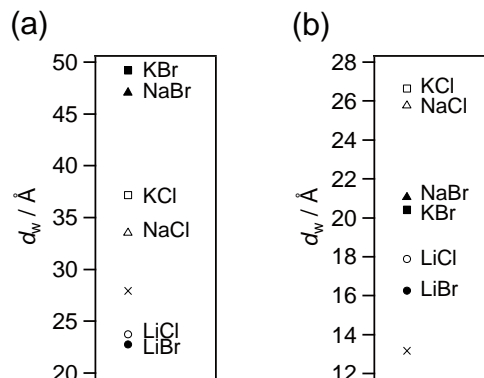


図 2：各塩を 3 M 添加した際の(a) POPC および(b) POPE のラメラ相における水層の厚み。バツ印は塩の添加がない場合。

過去に KBr と KCl を DLPC という脂質（親水基が POPC と同じ）に添加して膜間距離の変化を観測した研究でも、同様に塩の種類に依存した膜間距離の変化の仕方の違いを報告している [6]。この研究ではその違いの原因を膜へのイオンの吸着度合いの違いによると結論付けている。つまりイオン吸着によって膜の表面電位の絶対値が大きくなり、その結果膜間に働く静電斥力が増加する、その増加量が吸着度合いによって変わるということである。しかしこの研究では二つのサンプルだけの比較からこの結論を導いており、信頼性に欠けるものであった。

そこで本研究でもイオンの吸着度合いの違いを見るために各塩溶液での膜の表面電位 ( $\zeta$  電位) を求めた。図 3 にその結果を示す。この結果を見ると、先に示した膜間距離または水層の厚みのイオン種依存性とは異なり、カチオン依存性が大きく、アニオン依存性は小さいという結果となった。このイオン種依存性は膜間距離や水層の厚みのイオン種依存性とはまったく相関が無く、過去の研究のように膜へのイオン吸着によって静電斥力が大きくなるのが膜間距離の増加の原因とはいえないということが分かった。たしかに 3 M という高塩濃度では静電斥力のおよぼ範囲（デバイ長）は 1 Å 程度にまで小さくなるため、静電斥力がこのような大きな膜間距離の増加の原因ではないことは直感的にも正しそうである。

ではなぜ添加した塩の種類によって膜間距離の変化のしかたが異なるのか、そもそもなぜ塩の添加によって多くの場合に膜間距離は増加するのか。現時点では決定的な答えはまだわからない。しかしいくつかの可能性が考えられる。まずは、塩に

よる遮蔽によって van der Waals 相互作用が変化する可能性である。この効果は先の先行研究[6]で調べられており、遮蔽の効果に対するイオン種依存性は小さいことが分かっている。同様に膜の揺らぎに起因した立体斥力に対してもイオン種依存性は小さいことが分かっている。また膜間に働く短距離斥力はそもそも働く距離スケールが今の水の厚みに比べて小さく、その変化が膜間距離にこれほど大きな影響を及ぼすとは考えにくい。つまりこれまで考えられてきた膜間相互作用の変化だけでは塩による膜間距離の増加およびそのイオン種依存性は全く説明できないことになる。

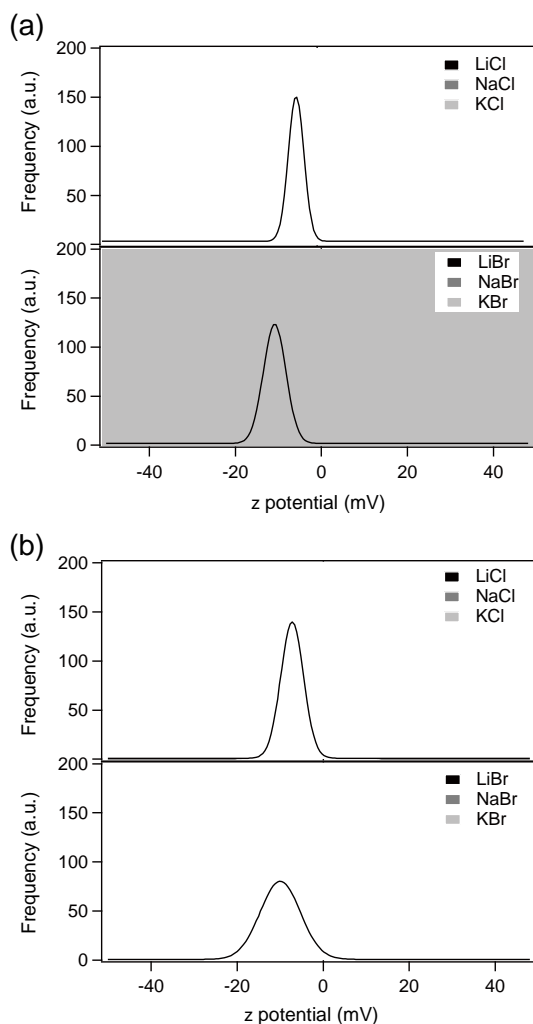


図 3：各塩を 100 mM 添加した際の脂質膜の表面電位。(a) POPC、(b) POPE。それぞれ上が塩化物塩、下が臭化物塩を添加したとき。実線は Gaussian でフィットした結果。

他の効果についても考えてみる。高塩濃度下ではイオンが膜間に均一に入らず、バルク（過剰水相）の塩濃度が高くなることが知られている。しかし、この膜間からのイオンの排斥により生まれる浸透圧差は膜間距離を小さくするほうに働くはずである。またこの排斥によるデバイ長の伸長も

考えられる。これは膜間距離を広げるほうに働き、また排斥の大きさもイオン種依存性があることが知られるため、もっともらしく思われる。しかし、もしも仮に添加した 1 M の塩のうちの半分が膜間から排斥され、膜間では 500 mM になったとしてもデバイ長はわずか 1.3 Å しか伸長しない。これほど多くのイオンが排斥されたと仮定しても伸長は実際の結果に比べわずかである。しかも、POPC の場合には Cl をアニオンに持つ塩のほうが Br の場合に比べて多く排斥されるにも関わらず、膜間距離の増大は Br を持つ塩のほうが大きく、やはりうまく説明ができない。つまり、この塩の不均一分布も膜間距離の増大の説明には不適切であることがわかる。

最後に考えられるのは序論で述べたように水和水などの水の不均一性の効果である。この効果の大きさが塩によって変化した場合に膜間距離が大きくなるのか、小さくなるのかはわからない。しかし、今回の研究でわかった、膜間距離の変化に大きなイオン種依存性があったこと、そのイオン種依存性が脂質の親水基頭部の構造によって大きく異なっているということはそこに水の構造の変化が影響している可能性が大きいことを示している。これまでミセルの凝集などで見られたホフマイスター効果と同様に、添加イオン種が異なれば、イオンの価数が同じであっても水の水素結合ネットワーク構造に与える影響は異なり、それによって膜間の相互作用がうける影響も異なっているのではないかと考えられる。今回使用した二つの脂質は水和状態が大きく異なることがわかってる。脂質間で塩の添加に対する振る舞いが違うということは膜周辺の水が膜間相互作用に何らかの関わりをもっているという考えを支持するものである。

#### 4 まとめ

本研究では電氣的に中性のリン脂質を二種類用い、その膜間に働く相互作用が添加された塩によってどのように影響を受けるのかを調べた。一価のアニオンとカチオンをもつ六種類の塩を添加して膜間距離を測定したところ、膜間距離の変化には大きなイオン種依存性および脂質の頭部構造依存性があることがわかった。膜の表面電位の測定との比較から、この塩による膜間距離の変化は、従来の膜間相互作用の枠組みでは理解できないことが明らかとなった。大きなイオン種依存性、脂質頭部構造依存性から、この膜間距離の変化には膜の周囲の水の水素結合ネットワークの構造がイオンによって変化されることが関与しているのではないかと考えられる。ソフトマターの周囲の水が自己組織化や“弱い”相互作用に対しても役割は、今後、脂質膜だけでなくソフトマター全般において、広く研究されていくべきであると考えられる。

謝辞

X線小角散乱実験は Photon Factory BL6A で行われました。その際、五十嵐教之准教授 (KEK)、清水伸隆特別准教授 (KEK) には実験サポートで大変お世話になりました。また実験結果の考察については筑波大学の齋藤一弥教授、山村泰久准教授と議論させていただき、有意義なご意見を多数頂きました。みなさま大変ありがとうございました。

参考文献

- [1] M. Hishida, K. Tanaka, *Phys. Rev. Lett.* **106**, 158102, (2011).
- [2] M. Hishida, K. Tanaka, *J. Phys.: Condens. Matter* **24**, 284113, (2012).
- [3] M. Hishida, K. Tanaka, Y. Yamamura, K. Saito, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **83**, 044801, (2014).
- [4] M. Hishida, Y. Yamamura, K. Saito *submitted*.
- [5] V. Luzzati, *Chapter 3 in Biological Membranes (edit. by Chapman, D.)* (Academic Press, New York, 1968).
- [6] H. I. Petrache, T. Zemb, L. Belloni, V. A. Parsegian, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 7982, (2006).

\* hishida@chem.tsukuba.ac.jp