

氏 名 Md. Khalidur Rahman

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2446 号

学位授与の日付 2023 年 9 月 28 日

学位授与の要件 高エネルギー加速器科学研究科 物質構造科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Hydration water dynamics between phospholipid bilayers

論文審査委員 主 査 青木 裕之
物質構造科学コース 教授
清水 伸隆
物質構造科学コース 教授
遠藤 仁
物質構造科学コース 准教授
山田 悟史
物質構造科学コース 准教授
瀬戸 秀紀
物質構造科学コース 教授
樋口 祐次
九州大学 情報基盤研究開発センター 准教授

Summary of Doctoral Thesis

Name in Full : **Md. Khalidur Rahman**

Title : **Hydration water dynamics between phospholipid bilayers**

The eukaryotic cells contain different types of organelles like the nucleus, mitochondria, cytoplasm, etc those are surrounded by the biomembrane.¹ Also, some organelles such as nucleus, mitochondria etc are surrounded by the biomembrane. The biomembrane is not a solid wall. The ion and biomolecules can pass through the biomembrane by membrane proteins.² In addition, cells and organelles can exchange their inner contents by membrane fusion. The biomembrane is consists of phospholipids bilayers made by different phospholipids, proteins, carbohydrates, etc.¹ The phospholipid has two parts, hydrophilic headgroup, and hydrophobic tail. The headgroup of the phospholipids is strongly connected with water. Thus, the phospholipid bilayer in the biomembrane is surrounded by water molecules as shown in Figure 1.

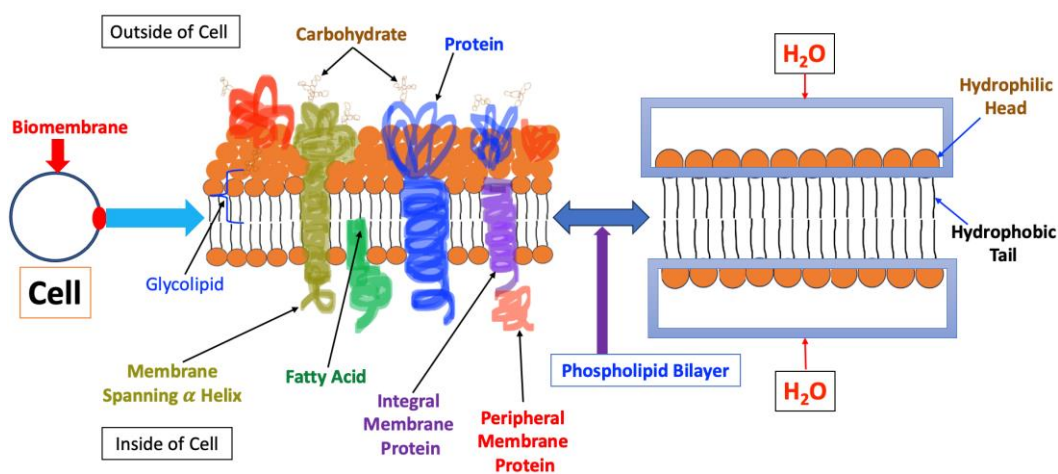


Fig. 1. Phospholipid bilayer in biomembrane is surrounded by water

A recent study suggests that the amount of water is responsible for the phospholipid-protein complex dynamics.³ Another study suggests that phosphatidylethanolamine (PE), one of the major phospholipids in the biomembrane are responsible for membrane fusion.⁴ To understand this process clearly simplification is necessary because real biomembrane is too complex. Thus, studying model membranes, by using the phospholipid, water, protein, etc is essentially important to understand the different types of biological functions in the real biomembrane. Last few decades, various studies have been done on the phospholipid-water model membrane by various experimental techniques. The phospholipids in water easily form lamellar and/or multilamellar vesicle (MLV). The details are shown in Figure 2.

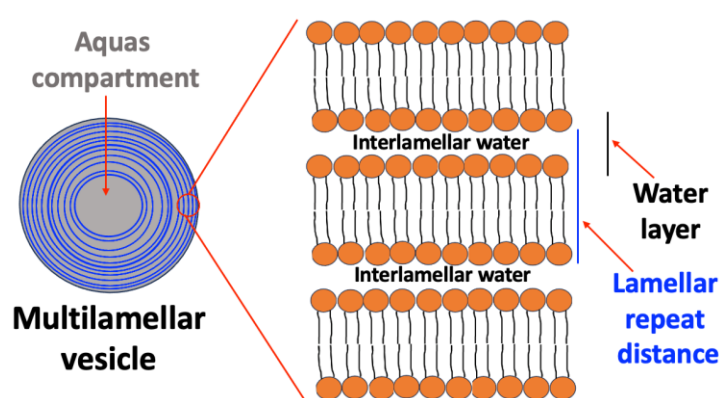


Fig. 2. Multilamellar formation in MLV

The water molecule in phospholipids interacts with the headgroup of the phospholipids which is known as hydration water (HW). Investigations by the different techniques suggest that bonding, dynamics, and orientation of the HW molecules varied in the different parts of the headgroup of the same phospholipid. In addition, the dynamics of HW varied depending on the headgroup structure of the phospholipids.⁵

Hishida *et al.* investigated phosphocholine (PC) and PE phospholipid mixed with water by the small angle X-ray scattering (SAXS), Grazing-incidence small-angle X-ray scattering (GISAXS), and Tera-hertz (THz) spectroscopy.⁵ SAXS confirmed that number of HW between a fully hydrated PE bilayers is lower than that the PC bilayers. GISAXS experiment confirmed that PE phospholipid easily undergo lamellar to inverted hexagonal phase (intermediate process of membrane fusion) due to its different hydration state than the PC phospholipid. THz spectroscopy revealed that HW in PE is approximately three times faster than the bulk water while the HW in PC is slower than the bulk water. But the THz spectroscopy is unable to clarify the origin of the fast HW in PE. The only difference between PC and PE is their headgroup structure. Figures 3 (a) and (b) show the structure of 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC, a type of PC phospholipid) and 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DMPE, a type of PE phospholipid), respectively.

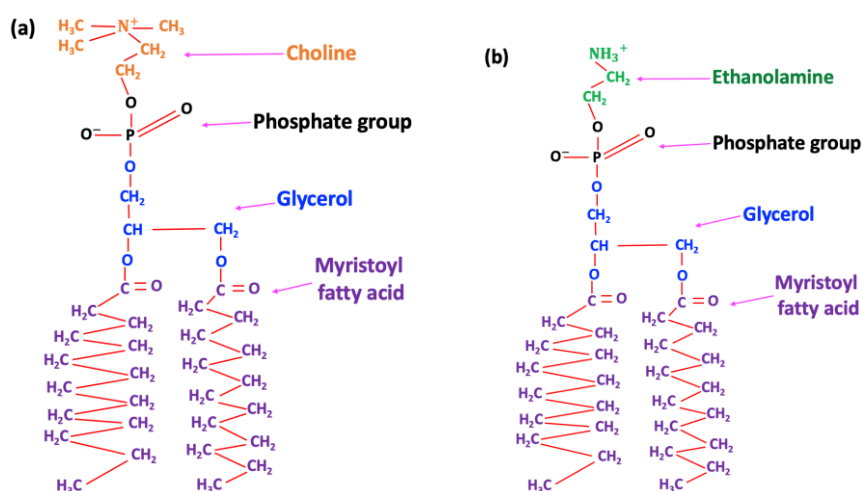


FIG. 3. Chemical structure of (a) DMPC and (b) DMPE phospholipid

Recently, Yamada *et al.* investigated DMPC by quasi-elastic neutron scattering (QENS).⁶ They observed three different types of HW classified as free HW (similar dynamics to bulk water), loosely bound HW (10 times slower than bulk water), and tightly bound HW (100 times slower than bulk water). In addition, by adding MgCl₂ and FeCl₂ cationic salt in the headgroup of DMPC, they clarified that the hydration state in DMPC was changed.⁷ This study suggests that for the small change of headgroup between two phospholipids, the hydration state between them could be significantly different. However, the origin of fast HW in DMPE still not clarified. In addition, comparison of the full hydration state between DMPC and DMPE is also still not revealed. As the only difference between DMPC and DMPE is their headgroup structure and the headgroup is strongly connected with the HW. Thus, origin of the headgroup dynamics of DMPE may able to explain different hydration state in DMPE. However, the headgroup dynamics of DMPE and their origin are still not clarified.

To investigate the HW dynamics in DMPE, QENS is a powerful tool.⁸ In this thesis, two samples are measured by QENS as tail-deuterated DMPE(d₅₄DMPE)-10D₂O and d₅₄DMPE-10H₂O. At first, the headgroup dynamics of DMPE were investigated for the mixture of d₅₄DMPE-10D₂O by QENS and the QENS profiles were interpreted as consisting of three modes as slow, medium speed and fast. But QENS was not able to clarify the origin of the medium speed and fast dynamics of the DMPE headgroup. Thus, molecular dynamics (MD) simulation was performed to reveal the origin of those

dynamics. Finally, QENS and MD simulation revealed that the fast mode comprised the rotation of hydrogen atoms in $-\text{NH}_3^+$ and $-\text{CH}_2-$ groups in the headgroup of DMPE, the medium speed mode comprised fluctuations in the entire DMPE molecule, and the slow mode comprised fluctuations in the membrane.

Finally, the dynamics of HW in DMPE were investigated by QENS via the $\text{d}_{54}\text{DMPE}-10\text{H}_2\text{O}$ sample after separating the headgroup dynamics of DMPE. The QENS profiles were analyzed in terms of three modes: (1) a slow HW, similar to the loosely bound HW in DMPC (10 times fewer diffusion than bulk water),⁶ (2) medium speed HW that is faster than free HW in DMPC (similar diffusion with bulk water),⁶ and (3) fast HW, identified as a rotational motion. The relaxation time for the fast HW was approximately six times shorter than that in DMPC,⁹ and approximately three times faster than the bulk water,⁵ consistent with the results of THz time-domain spectroscopy.

QENS reveals that the activation energy of the medium speed HW (similar to bulk water) in DMPE is lower than that in DMPC. For this reason, the medium speed HW in DMPE is faster than that in DMPC. Thus, this thesis concludes that due to the low activation energy of HW molecules in the phospholipid, the HW molecules can move fast.

Three different types of DMPE headgroup dynamics are observed. Among them, the medium speed mode was observed for the fluctuation of the entire DMPE molecule. It could be a major reason for the different hydration state in DMPE than that of DMPC.

In general, only for the small difference in the headgroup between DMPC and DMPE, the hydration state between them is significantly different.

Reference:

- ¹G. M. Cooper, "The cell: A molecular approach," eighth edition (2018).
- ²H. Suzuki, and S. Takeuchi, "Microtechnologies for membrane protein studies," *Anal. Bioanal. Chem.* 391:2695 (2008).
- ³J. Fitter, R. E. Lechner, and N. A. Dencher, "Interactions of Hydration Water and Biological
- ⁴K. Emoto, T. Kobayashi, A. Yamaji, H. Aizawa, I. Yahara, K. Inoue, and M. Umeda, "Redistribution of phosphatidylethanolamine at the cleavage furrow of dividing cells during cytokinesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 12867 (1996).
- ⁵M. Hishida, K. Tanaka, Y. Yamamura, and K. Saito, "Cooperativity between water and lipids in lamellar to inverted-hexagonal phase transition," *J. Phys. Soc. Jpn.* 83, 044801 (2014).
- ⁶T. Yamada, N. Takahashi, T. Tominaga, S. Takata, and H. Seto, "Dynamical behavior of hydration water molecules between phospholipid membranes," *J. Phys. Chem. B* 121, 8322 (2017).
- ⁷T. Yamada, and H. Seto, "Quasi-elastic neutron scattering studies on hydration water in phospholipid membranes," *Front. Chem.* 8 (8), (2020).

⁸T. Yamada, and H. Seto, “Quasi-elastic neutron scattering studies on hydration water in phospholipid membranes,” *Front. Chem.* 8 (8), (2020).

⁹D.-H. Choi, H. Son, S. Jung, J. Park, W.-Y. Park, O. S. Kwon, and G.-S. Park, “Dielectric relaxation change of water upon phase transition of a lipid bilayer probed by terahertz time domain spectroscopy,” *J. Chem. Phys.* 137, 175101 (2012).

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 RAHMAN MD. KHALIDUR

Title
論文題目 Hydration water dynamics between phospholipid bilayers

人体の 60%程度が水である、とされていることから分かるように、生体を構成する物質は水の中で機能している、と言って良い。このような観点から生体分子と水の関係について調べた研究は非常に多いが、生体を構成する分子の多様性と水の物性の複雑さの両面からまだまだ解明すべき点は多い。

リン脂質は細胞膜の主要な構成成分の一つで、親水基と疎水基を含む「両親媒性」の性質を持つことから、水中では疎水基を水から遠ざかるように会合して二重膜を作る。細胞膜はリン脂質膜二重膜とタンパク質や糖脂質など様々な生体物質が複合した構造をしていることから、リン脂質二重膜は生体膜の基本的な物性を明らかにするためのモデル系とされてきている。

本研究では中性子準弾性散乱(Quasi-Elastic Neutron Scattering, QENS)を用いることにより、リン脂質の一種であるジミリスチルフォスファチジルエタノールアミン(DMPE)と水和水の運動状態を調べ、それらの関係を明らかにすることを目的とした。これまで、中性子準弾性散乱により親水基の化学構造が違うジミリスチルフォスファチジルコリン(DMPC)の水和水の運動状態解析が行われてきており、バルク水と同程度の拡散係数を持つ「自由水」と、それよりも 1 桁遅い「弱結合水」、更に 1 桁遅くリン脂質分子と同程度の拡散係数をもつ「強結合水」が存在することが明らかになっている。また「弱結合水」はリン脂質分子 1 個当たり 10 個程度存在すること、その数は塩の添加によっては変化しないことなどが分かっていた。一方 DMPE についてはテラヘルツ分光と MD シミュレーションの結果が知られており、水和水がバルク水より速く動くという結果が得られている。すなわち、DMPE の水和水の運動状態を調べることにより、リン脂質の親水基の化学構造と水和水の運動状態の関係を明らかにすることが期待できる。

中性子散乱は干渉性散乱と非干渉性散乱に分けられるが、軽水素の強い非干渉性散乱のエネルギー変化を調べることにより、軽水素を含む分子の運動状態を明らかにできる、と言う特徴がある。そこで本研究では疎水基のみを重水素化した d_{54} DMPC に、水として重水 D_2O を加えた試料と軽水 H_2O を加えた試料の 2 種類を用意して、親水基の運動状態を明らかにするための実験と、水和水の運動状態を明らかにするための実験を行った。

実験は J-PARC の物質生命科学実験施設(MLF)の BL02 に設置されているダイナミクス解析装置 DNA を用いて行った。その結果、 d_{54} DMPC + D_2O から得られた QENS シグナルは 3 種類のモードの組み合わせで解析できることが分かった。これらのモードの Q 依存性を解析し、MD シミュレーションの結果と合わせることにより、リン脂質分子の膜内での拡散と親水基の傾きを伴う運動、及びアミン基またはメチレン基の運動に対応することを明らかにした。

続いて $d_{54}\text{DMPC} + \text{H}_2\text{O}$ から得られる QENS シグナルは親水基と水和水の双方からの情報を含むことから、 $d_{54}\text{DMPC} + \text{D}_2\text{O}$ から得られた親水基の運動状態に関する情報を考慮して解析を行い、水和水の運動状態を明らかにした。その結果、DMPC で見られた「強結合水」は確認できなかったが、「自由水」と「弱結合水」と解釈できる状態が存在することが分かった。加えて QENS シグナルの速い成分から、水の回転緩和が同定できた。この回転を特徴づける緩和時間は DMPC の 6 倍で、テラヘルツ分光の結果と一致することが分かった。次に水の運動状態を特徴づける物理量である平均滞在時間の温度依存性から、「自由水」と「弱結合水」の活性化エネルギーを見積もった。その結果「弱結合水」の活性化エネルギーは DMPC の場合とほぼ同じだったのに対して、「自由水」に対しては 1/5 ほどの値だった。この結果から、PE 脂質のアミン基との相互作用により自由水のネットワーク構造が変化している、と言う結論が得られた。すなわち DMPC の水和水の QENS 実験で明らかになった 3 種類の水は層状に重なっているのではなく、親水基の化学構造に対応した分布となっていることを示唆する結果となった。

本審査の発表では、予備審査での指摘事項であった (1) これまでの関連研究の流れを整理して、本研究の位置づけを明確にすること、(2) 主要な実験方法とその解析及び結果の意味を示すこと、に関して改善が見られた。また質疑応答にも的確に答え、研究内容及び関連する分野に関する十分な知見があることを示した。更に発表と質疑は英語で行ったこと、加えて英語の論文を投稿中であり、国際会議での口頭発表も経験していることから、英語に関する十分な能力があることも示した。以上の結果により、本審査委員会は全員一致で博士論文の本審査合格と判定した。