

水溶性の球状タンパク質は、水溶液中で疎水基を内側に、親水基を外側に向けた構造をとることから、気液界面では疎水基を気相側に向けてアンフォールドすることが予測される。アンフォールドのドライビングフォースとしては、界面との疎水性相互作用の他に、エントロピー効果や分子間相互作用、静電相互作用がある。よって、どのような条件でどのようにアンフォールドするかを観測することで、タンパク質のアンフォールドのメカニズムひいては立体構造形成機構に関する知見を得ることができると思われる。

リゾチームは、 $30 \times 30 \times 45 \text{Å}^3$ の大きさを持つ楕円体型のタンパク質である。分子内にS-S結合を4つ持つため、比較的固い分子だとみなされ、平衡状態の表面吸着量や膜厚から気液界面ではアンフォールドしないと考えられてきた^{1,2}。ところが最近、表面敏感な分光法によって、 α ヘリックスの一部が β シートに変化していることが観測された^{3,4}。そこで我々は、時分割X線反射率法によって、気液界面のリゾチームの構造を追跡したところ、吸着過程でリゾチームの3次構造が大きく変化していることを観測したので報告する。

実験は我々がSPring-8のBL37XUビームラインに立ち上げた溶液界面X線反射率計を用いて行った。この装置はわずか150秒で $q < 0.5 \text{Å}^{-1}$ までの範囲を測定することが可能である。液体ディスペンサーを用いたタンパク質自動注入システムと組み合わせ、リゾチームをpH7のリン酸緩衝溶液に注入、4秒後からのデータを取得することに成功した。

図1は注入直後のリゾチームのX線反射率プロファイル(左)と、得られた界面深さ方向

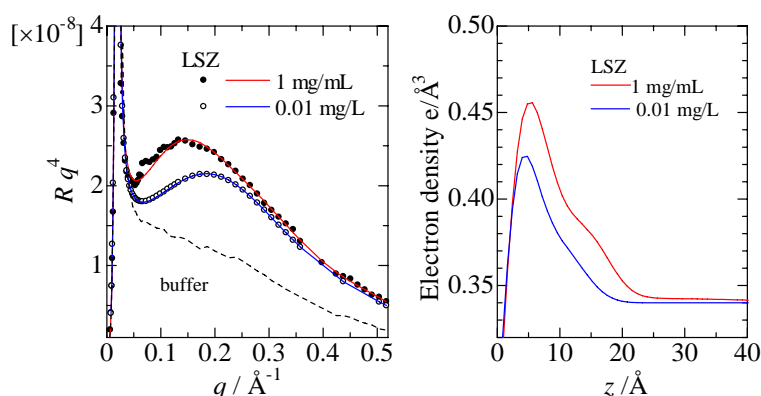


Fig. 1 注入直後のリゾチーム

左: X線反射率プロファイル
右: フィッティング(左実線)によって得られた密度プロファイル

注入4秒後に測定開始、測定時間は150秒。ネイティブの状態より薄く扁平しており、濃度が低いほど厚さも薄い

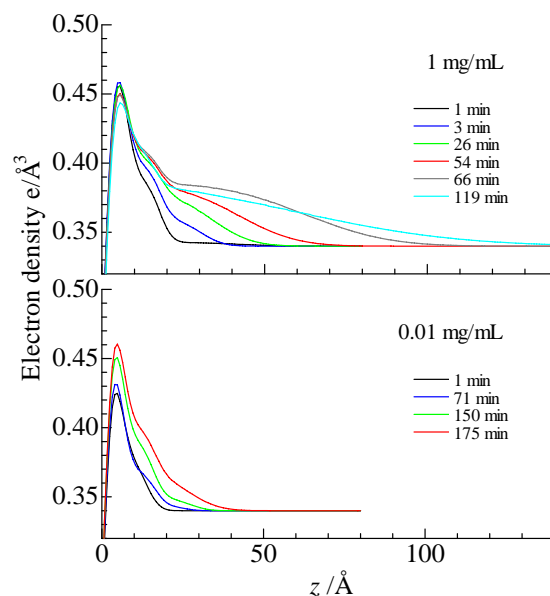


Fig. 2 界面吸着リゾチームの密度プロファイルの時間変化

上: 1mg/mL、下: 0.01mg/mL

の密度プロファイルである。注入後のリゾチームの濃度を図中に記した。吸着直後のリゾチームは高密度の上層と低密度の下層からなり、合わせた厚さは 20Å 以下であることがわかる。これはネイティブの状態の厚さ(最小 30Å)よりも薄い。また濃度が低くなると、リゾチームの密度と厚さが伴って低くなっているのがわかる。

図2は、密度プロファイルの時間変化を示したものである。溶液濃度によって変化の仕方が大きく異なっているのがわかる。1mg/mLの場合は、上層の密度プロファイルは変化せず、下層の密度および厚さが徐々に増加してい

た。一方 0.01mg/mL の場合は、上層および下層の密度が増加し、175 分後のデータは、1mg/mL の場合の 6 分後のプロファイルと完全に一致した。

同時に測定していた表面圧の変化を図 3(a) に示す。1mg/mL の場合は一般の界面活性剤と同様に注入と同時に表面圧の急激な上昇が見られた。一方、0.01mg/mL の場合は始め 2 時間ほど表面圧がほとんど変化しなかった。これは induction time と呼ばれ、リゾチームなどの堅いタンパク質が低濃度の場合に見られる現象である⁵。蛍光顕微鏡によって、リゾチームが単分子で吸着している状態であることが観測されている⁶。よって、図 2 と合わせて考えると、induction time ではリゾチームは単分子膜濃度以下で吸着しているということが予想される。膜の濃度を評価するために、図 2 のプロファイルから水の電子密度($0.34e/\text{\AA}^3$) を差し引き、積分したものをリゾチームの表面過剰量として図 3(b) に示した。興味深いことに 1mg/mL には、2 つのステップが観測された。2 番目のステップは 1 番目の値のちょうど 2 倍になっていることから、始めのステップは単分子膜、2 番目は二分子膜が形成されたと考えられる。また、0.01mg/mL の 175 分後の値は単分子膜形成濃度に近いことがわかる。

図 1-3 を合わせるとリゾチームの気液界面吸着過程について次のようなことが言える。

1. ガス状吸着: 吸着初期段階にはリゾチームは単分子で吸着する。この時、界面に広がるようにアンフォールドする。分光の結果と併せると、 α ヘリックスが β シートに変化することで薄く扁平していると考えられる。
2. 単分子膜形成: $0.45 e/\text{\AA}^3$ に達すると、リゾチーム同士の相互作用により、深さ方向に伸び始める。
3. 二分子膜形成: リゾチーム単分子膜との相互作用により二分子膜形成を形成する。ラフな多層膜が形成される前に、一旦、二分子膜ができる。
4. 多層膜形成: 二分子膜の下部が伸び、多層膜を形成する

4 については、本研究では観測されていないが、1mg/mL の場合の平衡表面圧が 20 mN/m であることから、本研究の範囲では平衡状態に達していないと思われる。

以上より、気液界面ではリゾチームはネイティブより薄くアンフォールドしていることが観測された。また、吸着量が増加するとリゾチーム同士の相互作用により絶えずコンフィギ

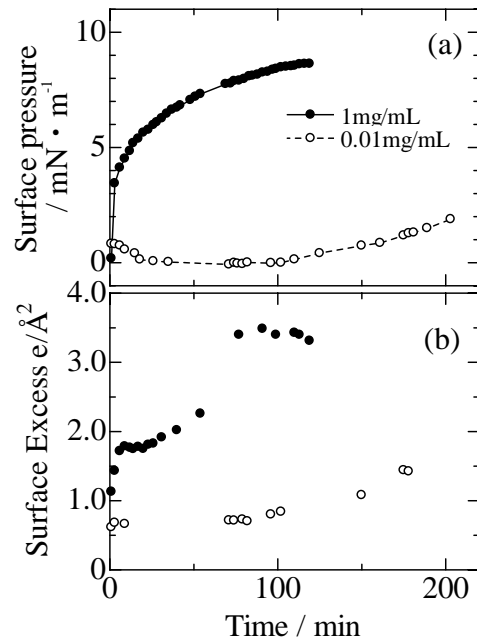


Fig. 3 界面吸着リゾチームの (a) 表面圧および (b) 表面過剰量の時間変化

ュレーション変化を起こしていることがわかった。これまでリゾチームは疎水性の固体基板上ではアンフォールドし⁷、親水性の基板上ではアンフォールドしない⁸ことが観測されていることから、気液界面でのアンフォールドのドライビングフォースは「疎水性界面との相互作用」であると言える。逆に言えば、リゾチームが水溶液中で球形を保っているのは、周囲を取り囲む水との親水的な相互作用によると言える。

¹ J. R. Hunter, P. K. Kilpatrick, and R. G. Carbonell, *J. Colloid Interface Sci.*, **1990**, 137, 462-482.

² J. R. Lu, T. J. Su, R. K. Thomas, J. Penfold and J. Webster, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1998**, 94, 3279-3287.

³ C. Postel, O. Abillon, and B. Desbat, *J. Colloid Interface Sci.*, **2003**, 266, 74-81.

⁴ M. D. Lad, F. Birembaut, J. M. Matthew, R. A. Frazier and R. J. Green, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2006**, 8, 2179-2186.

⁵ B. C. Tripp, J. J. Magna and J. D. Andrade, *J. Colloid Interface Sci.*, **1995**, 173, 16-27.

⁶ J. S. Erickson, S. Sundaram, and K. J. Stebe, *Langmuir*, **2000**, 16, 5072-5078.

⁷ J. R. Lu, T. J. Su, P. N. Thirtle, R. K. Thomas, A. R. Rennie, and R. Cubitt, *J. Colloid Interface Sci.*, **1998**, 206, 212-223.

⁸ F. Evers, K. Shokuie, M. Paulus, C. Sternemann, C. Czeslik, and M. Tolan, *Langmuir*, in press.