

## 2B15 X線反射率法によるタンパク質の界面吸着ダイナミクスの観測

### —リゾチームに潜む静電相互作用の抽出—

(立命館 SLLS<sup>1</sup>, JASRI SPring-8<sup>2</sup>)

○矢野陽子<sup>1</sup>, 宇留賀朋哉<sup>2</sup>, 谷田肇<sup>2</sup>, 豊川秀訓<sup>2</sup>, 高垣昌史<sup>2</sup>, 寺田靖子<sup>2</sup>, 山田廣成<sup>1</sup>

球状タンパク質リゾチームを 2M NaCl, pH7 のリン酸緩衝溶液に注入し、気液界面に吸着する過程で生じる構造変化を X 線反射率/散漫散乱によって 3 次元解析した。その結果、リゾチームは疎水性相互作用によって、始めは単分子で界面に吸着するが、NaCl との静電相互作用によって徐々にリゾチーム同士の相互作用が増加し、2 時間後には Cl イオンを介した島状の凝集体を形成することがわかった。

タンパク質は外部環境の変化に応じて容易に変性する。変性を誘発する代表的な外的要因としては、熱(エントロピー)、pH(荷電状態)、圧力(分子体積)、変性剤(分子内結合)などがある。各々の要因による変性のドライビングフォース(括弧内に記載)は異なるから、各々異なった立体構造に変化することが予測される。よって、変性のドライビングフォースと変性構造とを相関付けることによって、タンパク質の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。

上記以外には、タンパク質の界面変性がある。タンパク質は、疎水性と親水性のアミノ酸残基を併せ持つ両親媒性分子であるから、一般の界面活性剤のように水溶液表面に選択的に吸着するが、それに伴い、ネイティブとは異なる立体構造に変性する。昨年、我々は pH7 のリン酸緩衝溶液中に球状タンパク質リゾチーム(LSZ)を注入し、注入 1 分後から 2 時間に渡る構造変化を時分割 X 線反射率法を用いて追跡した。その結果、気液界面に吸着した LSZ は、ネイティブよりも薄くアンフォールドしており、その変性の原因が気相との疎水性相互作用にあることを見出した[1]。

一方、LSZ の等電点は pH11.5 であり、pH7 では正に帯電している。よって、塩添加効果を観測することにより、リゾチームに潜む静電相互作用を選択的に抽出できると思われる。塩を添加することによって、リゾチームの界面吸着量は増加することが知られている[2]。

### 1 実験法

X 線反射率法(XRR)は、X 線の全反射現象を利用した界面の構造解析手法である。界面深さ

方向の電子密度分布をサブナノメートルオーダーの分解能で観測できることから、表面に吸着したタンパク質の 3 次構造に関する構造を得ることができ、2 次構造を観測する振動分光法

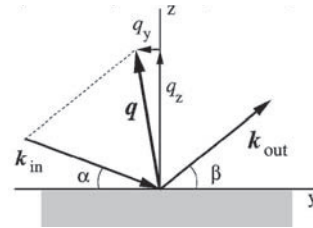


図1 X線反射率法の幾何学的配置

とは相補的な実験手法である。XRR は、X 線の入射角  $\alpha$  と反射角  $\beta$  で決まる散乱ベクトル  $q$  (図1) が界面垂直方向  $z$  に一致するため、界面深さ方向の構造情報しか含まない。一方、反射スポットの周囲に生じる散漫散乱は界面水平方向  $y$  の構造情報も含む。散漫散乱は散乱角  $\beta$  を走査して測定するのが通常だが、2次元検出器を用いれば、散漫散乱も同時に観測することができる。我々は SPring-8/BL37XU の溶液界面反射率計[3, 4]を用いて、pH7, 2M NaCl 水溶液に注入した卵白 LSZ (注入後濃度 1mg/mL) が気液界面に吸着する過程で生じる構造変化を追跡した。

## 2 結果と考察

### 2.1 X線反射率法

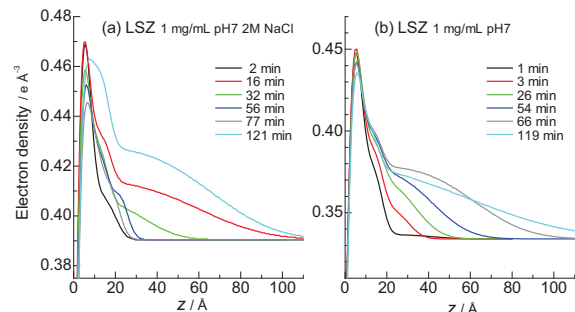


図2 電子密度プロファイルの時間変化  
(a) 塩添加あり (b) 塩添加なし

図2に XRR より得られた深さ方向の電子密

度分布プロファイルを示す。

$z < 20\text{\AA}$  はネイティブより薄くアンフォールドした高密度な第1層、 $z > 20\text{\AA}$  はフレキシブルで低密度な第2層である。塩添加なしでは、吸着過程で第1層はほとんど変化せず、第2層のみの厚さが徐々に厚くなっていくのが観測された[1]のに対し、塩添加ありでは、16分後にすでに塩添加なし119分後と同様のパターンが得られている。ところが、その後、一旦、気液界面に吸着したタンパク質の密度が減少し、121分後には塩添加なしとは全く異なる第1層のプロファイルが得られた。どうやら32分後にLSZの吸着層の再変成が起こっているように思える。そこで、散乱散漫のプロファイルを検討することにした。

## 2.2 散漫散乱

図3は、反射周囲の散漫散乱の2次元画像である。赤で示した点が $\beta = \alpha$ となる鏡面反射であり、一直線上に散漫散乱が観測されている。緑で示したものは $\beta$ が全反射臨界角に一致した時に観測されるYoneda peakである。塩添加なしの場合は、散漫散乱の強度はほとんど変化しないのに対し(図3右)、塩を添加した場合は、散漫散乱の強度は明らかに増加した。

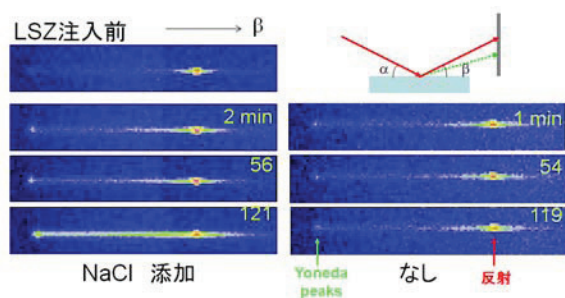


図3 反射と散漫散乱

左：塩添加あり、右：塩添加なし

塩添加ありの方は、徐々に反射周囲の散漫散乱が強くなっている

液体表面の場合、表面の熱揺らぎによって生じる表面張力波(Capillary Wave, CW)が大きな散漫散乱を生じる。CW以外に面内方向には均一で密度の偏りがない場合、散漫散乱はCWモデルだけで説明できる。図4はリン酸緩衝溶液のみとLSZ注入121分後の散漫散乱プロファイルの比較であるが、リン酸緩衝溶液はCWモデルで良く説明できるのに対し、LSZ注入121分後のデータは、CWモデルを大きく上回った。

実測からCWモデルを差し引き、これを式(1)によりフィットすると、表面内の相関距離 $\xi$ と表面の粗さ $\sigma_2$ が求まる。

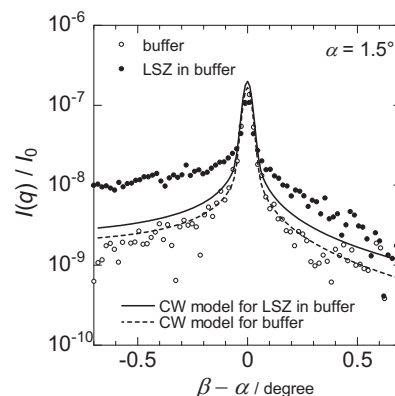


図4 X線散漫散乱プロファイル

○：リン酸緩衝溶液、●：LSZ注入121分後  
実線、破線はCWモデルによる計算値

$$\left[ \frac{I(q)}{I_0} \right]_{inhmg} \approx N \frac{e^{-\sigma_2^2 q^2}}{(1 + \xi^2 q^2)^3} \quad (1)$$

求められた表面内の相関距離 $\xi$ は、図5より30分以降に大きく減少していることから、始めは単分子で吸着していたLSZが、NaClとの

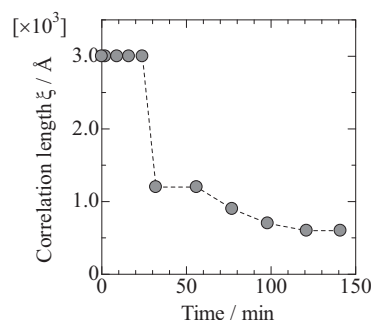


図5 表面内の相関距離 $\xi$ の時間変化

静電相互作用によって徐々にリゾチーム同士の相互作用が増加し、Clイオンを介した島状の凝集体を形成すると考えられる。表面内の相関距離 $\xi$ は島の直径に相当する。

[1] Y. F. Yano, T. Uruga, H. Tanida, H. Toyokawa, Y. Terada, M. Takagaki, and H. Yamada, *Langmuir*, **25**, 32 (2009).

[2] E. E. G. Rojas, S. R. Cimbria, L. A. Minim, S. H. Saravia, C. A. S. Silva, *J. Chromatogr. B* **840**, 85 (2006).

[3] Y. F. Yano, T. Uruga, H. Tanida, H. Toyokawa, Y. Terada, and M. Takagaki, *J. Phys. Conf. Ser.* **83**, 012024 (2007).

[4] Y. F. Yano, T. Uruga, H. Tanida, H. Toyokawa, Y. Terada, M. Takagaki, and H. Yamada, *Eur. Phys. Special Topics*, **167**, 101 (2009).