

1B08 リゾチームの界面吸着現象のリアルタイム観測: pH および塩添加効果

(立命館 SLLS¹, JASRI SPring-8²) ○矢野陽子¹, 宇留賀朋哉², 谷田肇², 寺田靖子², 山田廣成¹

球状タンパク質リゾチームの気液界面吸着過程を X 線反射率/散漫散乱によって 3 次元解析した。その結果、高濃度 NaCl 水溶液中において、吸着は (1)脱水和による界面吸着、(2)Cl⁻イオンを介した島状凝集体形成の 2 段階で起こり、リゾチームの conformation は (1)と(2)では大きく変化することがわかった。この現象は、Net charge が大きくなる pH3 では促進するが等電点近傍では抑制されることから、結晶核生成の初期過程を観測していると思われる。

タンパク質の結晶化は、タンパク質溶液の溶解度を変化させ高過飽和状態にして核が形成することによってはじまる。その時、添加剤として中性塩や有機溶媒を加えることで、タンパク質の溶解度を下げる。中性塩を添加する場合は、塩析(salting-out)と呼ばれ、塩の水和によって、タンパク質表面の水が奪われ、タンパク質-溶媒間相互作用よりもタンパク質-タンパク質間の相互作用が打ち勝つために凝析する。この塩析効果は、塩添加による表面張力上昇で説明できるという考え方がある[1, 2]。このことは、気液界面においてもタンパク質の塩析現象と同じことが起こっていることを意味する。そこで、我々はX線反射率法を用いて、高濃度NaCl存在下におけるリゾチームの気液界面吸着過程を追跡した。

X 線反射率法は、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とは相補的な実験手法である。これまで我々は 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追跡したところ、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報告している[3]。

1 実験法

SPring-8/BL37XU の溶液界面反射率計[4, 5]を用いて、X 線反射率測定を行った。異なる pH、塩添加の有り (2M NaCl)、無しのリン酸緩衝溶液に注入後の濃度が 1mg/mL になるように調整した卵白 LSZ を注入し、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

図 1 は、pH7 のリン酸緩衝溶液の塩添加の無し(a)有り(b)の場合の電子密度の時間変化である。塩添加無しの場合、厚さ 20 Å 程度の表面単分子膜を形成した後、水相側に新たに LSZ が吸着し多層膜を形成する。この時、表面単分子膜の密度は変化しない。一方、2M NaCl 水溶液中では、表面単分子膜の密度が時間とともに減少し、厚さが増していることがわかった。

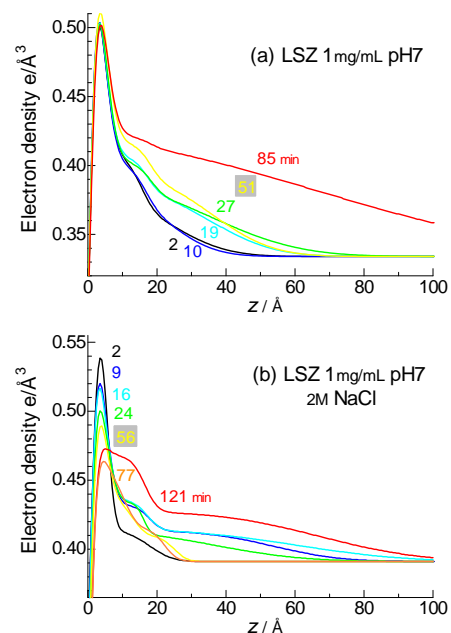


図 1 LSZ を pH7 の溶液に注入した後の電子密度の時間変化

図1を積分して、リゾチームの表面吸着量 Γ に換算したものを図2(b)に示す。塩添加無しでは、以前報告したものと同様[3]に、いったん単分子膜を形成した後に多層膜を形成するが、塩添加の場合は、単分子膜形成後に表面吸着量 Γ の減少が観測されていることから、単分子膜自体に変化が起きていると考えられる。

一方、散漫散乱から求めた界面平行方向の相関長を図2(a)に示す。表面吸着量が最小値の時に最大値をとり、その後減少している。このことは、表面に形成されたLSZの膜が不均一化していることを示唆している。すなわち、LSZは高濃度NaCl存在下において①単分子膜形成、②膜の不均一化、③凝集体形成の過程を経て吸着することがわかる。さらに興味深いことには、塩添加無では、一定だった表面単分子膜の厚さが増加していることである。このことは、界面吸着によってLSZが一旦アンフォールドしたのが、塩添加によってリフォールドしたようにも見える。

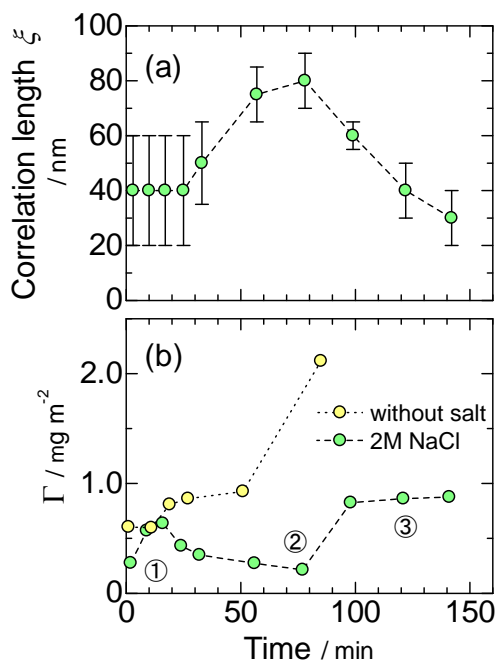


図2 LSZの表面相関長と吸着量の時間変化

同様の現象は、pH3の水溶液中では観測されたが、pH12では観測されなかったことから、この構造変化は、LSZが正に帯電している時に起こる現象であると考えられる。

以上のことを踏まえて、LSZの表面吸着

過程を模式化したのが図3である。②では、 Cl^- イオンがLSZの電荷を遮蔽することによって、凝集が開始する。このことは、LSZの結晶核生成と同じ現象を再現していると思われる。

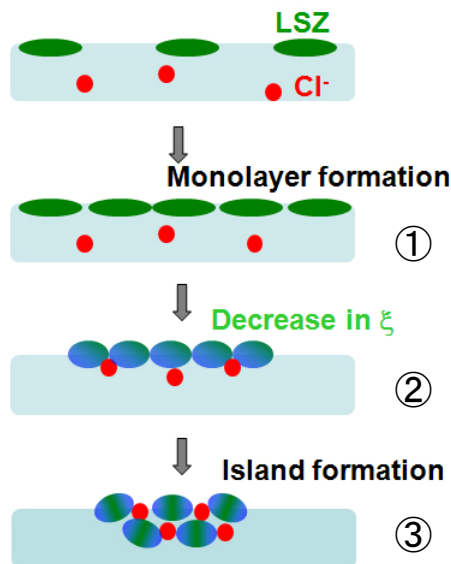


図3 高塩濃度下のLSZの表面吸着モデル

参考文献

- [1] R. L. Baldwin, *Biophys. J.* 71, 2056 (1996).
- [2] L. M. Pegram, M. T. Record Jr., *J. Phys. Chem. B* 111, 5411 (2007).
- [3] Y. F. Yano, T. Uruga, H. Tanida, H. Toyokawa, Y. Terada, M. Takagaki, and H. Yamada, *Langmuir*, 25, 32 (2009).
- [4] Y. F. Yano, T. Uruga, H. Tanida, H. Toyokawa, Y. Terada, and H. Yamada, *J. Synchrotron Rad.* 17, 511-516 (2010).
- [5] Y. F. Yano, T. Uruga, H. Tanida, H. Toyokawa, Y. Terada, M. Takagaki, and H. Yamada, *Eur. Phys. Special Topics*, 167, 101 (2009).