

## タンパク質の界面吸着ダイナミクスのナノスケール観測 Detection of a protein surface adsorption dynamics in nanometer scale

矢野陽子<sup>1</sup>, 宇留賀朋<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>

Yohko F. Yano<sup>1</sup>, Tomoya Uruga<sup>2</sup>, Hajime Tanida<sup>2</sup>, Hidenori Toyokawa<sup>2</sup>,

Yasuko Terada<sup>2</sup>, Masafumi Takagaki<sup>2</sup>, and Hironari Yamada<sup>1</sup>

立命館大学、<sup>2</sup>高輝度光科学研究センター

<sup>1</sup>Ritsumeikan University, <sup>2</sup>Japan Synchrotron Radiation Research Institute

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。

X-ray specular and off-specular reflection was investigated to analyze the out-of-plane and in-plane structures of a globular protein lysozyme adsorbed at an air/water interface in the presence of a salt. Lysozyme molecules once adsorbed monomolecular at the water surface gradually aggregate and form islands on the water surface.

キーワード : x-ray reflectivity, off-specular diffuse scattering, PILATUS, air/water interface, lysozyme

はじめに： 生体が物質を認識する、ということは、物質表面にタンパク質が吸着することによって起こる。また、人工組織や生体物質を使った新しい機能性材料の開発など、医学的および技術的応用の両面においても生体物質と界面の相互作用を知ることは非常に重要である。本研究では、水溶液中のタンパク質が界面との相互作用によって構造変化を起こす過程を直接観測することにより、タンパク質と界面の相互作用について理解する。

我々は 2007B に 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、pH 7 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]。

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。XRR は、X 線の入射角  $\alpha$  と反射角  $\beta$  で決まる散乱ベクトル  $q$  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 次元検出器である PILATUS 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。

## 結果と考察：

### 1 X線反射率法

図 1 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。

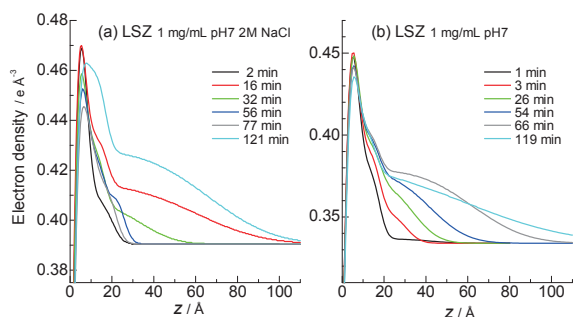


図 1 電子密度プロファイルの時間変化  
(a) 塩添加あり (b) 塩添加なし

### 2 散漫散乱

図 2 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。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 2 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。これは始めは単分子で吸着していた LSZ 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、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。

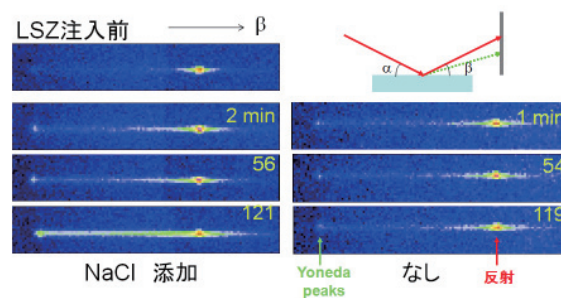


図 2 反射と散漫散乱  
左：塩添加あり、右：塩添加なし  
塩添加ありの方は、徐々に反射周囲の散漫散乱が強くなっている

### 参考文献

- [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).