

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24540444

研究課題名(和文) 界面に吸着したタンパク質のリアルタイム構造可視化システムの開発

研究課題名(英文) Development of visualization system of proteins adsorbed at interfaces

研究代表者

矢野 陽子(藤原陽子)(YANO, Yohko)

近畿大学・理工学部・准教授

研究者番号：70255264

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文): 本研究では、新たに実験室の白色X線を用いたエネルギー分散型X線反射率測定装置(ED-XRR)を製作し、それを既存の全反射赤外分光装置(FT-IR)と組み合わせて、液体/プリズム界面の構造をリアルタイムで検出するシステムを開発した。

ED-XRR装置を用いて10-5まで最短10秒でX線反射率測定が可能であることがわかった。また、5分でX線回折パターンも測定可能であることがわかった。

一方、タンパク質と塩の相互作用について、FT-IR単独測定による2次構造の追跡にも成功したが、ED-XRRとの同時測定はできなかった。しかしながら、X線回折との同時測定は可能であり、応用範囲は広いと思われる。

研究成果の概要(英文): We have constructed an energy dispersive X-ray reflectometer combined with ATR-FTIR system. The reflectivity data were obtained with high resolution even by use of a conventional x-ray tube. The reflectometer equipped achieved x-ray reflectivity towards 10-5 with the integration time of only 10 sec. We have also succeeded to perform X-ray diffraction and FT-IR simultaneously, having enormous potential for various measurements.

研究分野：生物物理学

キーワード：X線反射率 X線回折 FT-IR タンパク質 界面吸着

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質と界面の相互作用を知ることには、クロマトグラフィーによるタンパク質の分離・精製、食品や医薬品、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非常に重要である。

タンパク質の気液界面吸着過程は、古くから表面張力測定によって研究されてきた。吸着速度とタンパク質の性質を比較することにより、タンパク質表面の疎水性が高く（界面活性剤としての性質を持つ）、構造安定性の低い（変性しやすい）ものほど吸着平衡に達する速度が速いことがわかってきた。現在ではタンパク質の界面吸着過程の研究について、以下の3つのアプローチ方法がある。

1. 界面吸着量の時間変化を測定するもの（界面張力、水晶振動子マイクロバランス、表面プラズモン共鳴など）
2. 2次構造の変化を追跡するもの（全反射を利用した赤外吸収分光法や CD スペクトル）
3. 3次構造の変化を追跡するもの（X線反射率法）

1および2については、手法が確立されていて、専用の装置も市販されている。一方、X線反射率法（XRR）とは、全反射条件近傍の反射率の入射角依存性から、界面付近の電子密度分布をサブナノメートルの分解能で得るものである。時間分解能が低く、液体試料を扱うのが難しいといった問題があるが、最近、研究代表者らは SPring-8 に溶液界面反射率計を立ち上げ（Yano et al., Europhys. J. 2009; J. Synchrotron Rad., 2010）、初めてタンパク質の気液界面吸着過程の時分割測定に成功した（Yano et al., Langmuir, 2009）。これにより、これまで2次構造が変化しないと報告されていた BSA の3次構造は大きく変化することを見出した。すなわち、2次構造および3次構造の両方を知ることが重要になる。

## 2. 研究の目的

タンパク質の立体構造を決めるファクターには、ファン・デル・ワールス相互作用、疎水性相互作用、水素結合、イオン結合、鎖エントロピー、S-S 結合などがある。生体内のタンパク質はこれらの絶妙なバランスによって最も安定な構造（ネイティブ構造）をとっている。界面が存在する場合、タンパク質が界面に吸着するかどうかは、ネイティブ構造を維持する相互作用と界面との相互作用の競合によって決まる。例えば、タンパク質は疎水性界面に吸着する際には、構造変化（変性）を伴うことが多いが、親水性界面に吸着する際には変性しにくい。前者は、タンパク質内部にある疎水性の部位を表面に出そうとするためであり、すなわちタンパク質の界面における立体構造の変化を観測することによって、界面との相互作用に関する知見を得ることができる。このようなタンパク質と界面の相互作用を知ることが、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分野の基礎研究として重要である。本研究では、固液界面に吸着したタンパク質の2次および3次構造をリアルタイムで可視化するための装置を開発する。2次構造の検出には全反射赤外分光法(ATR-FTIR)、3次構造の検出にはX線反射率法(XRR)を用いる。秒オーダーの時間分解能で固液界面に吸着したタンパク質の立体構造を観測することを目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、新たに実験室の白色 X 線を用いたエネルギー分散型 X 線反射率測定装置（ED-XRR）を製作した。それを既存の全反射赤外分光装置(ATR-FTIR、サーモフィッシャー製 Nicolet iS5 FT-IR)と組み合わせ、図1のような液体/プリズム界面の構造をリアルタイムで検出するシステムを開発した。この装置をもちいてタンパク質が

ダイヤモンドプリズム表面に吸着する過程を、2つ手法を同期させて追跡し、吸着タンパク質の2次および3次構造を秒オーダーの時間分解能で同時に取得することを目指す。タンパク質の種類、溶液の温度および pH 依存性を検討することにより、タンパク質の固液界面との相互作用について考察する。

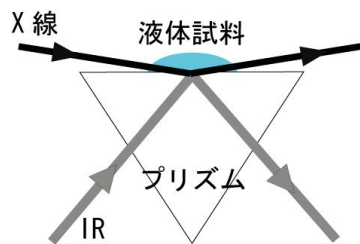


図 1 本研究で製作する ED-XRR/ATR-FTIP システム

#### 4. 研究成果

##### (1) 製作した ED-XRR 装置

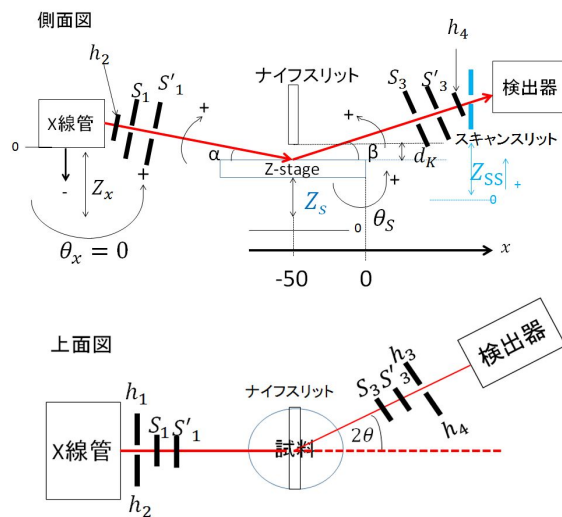


図 2 製作した ED-XRR 装置

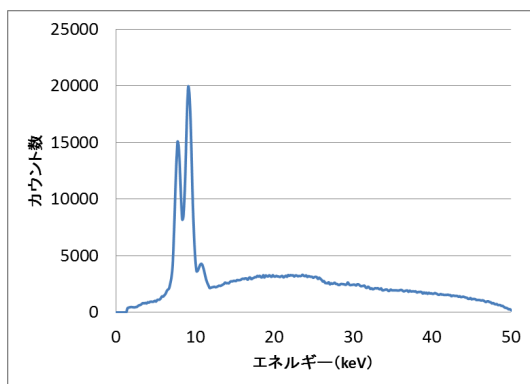


図 3 入射ビームのエネルギースペクトル

図 2 が本研究で製作したエネルギー分散型の X 線反射率測定装置である。また図 3 は、管電圧 50kV、管電流 20mA かけた時に X 線管 (W ターゲット) から発生した X 線のエネルギースペクトルである。スリット S1、S1'、h1、h2 により、入射ビームは幅 1.0 mm、高さ 0.2 mm に成形されている。

##### (2) X 線反射率測定

製作した ED-XRR 装置の性能を評価するために、既知の試料の X 線反射率測定を行った。管電圧 50kV、管電流 20mA、測定時間は 10分とした。また  $2\theta \neq 0$  の散乱強度を測定し、バックグラウンド (図 4) として反射強度から差し引いた後、入射エネルギースペクトルで割って、反射率を計算したものが図 5 である。

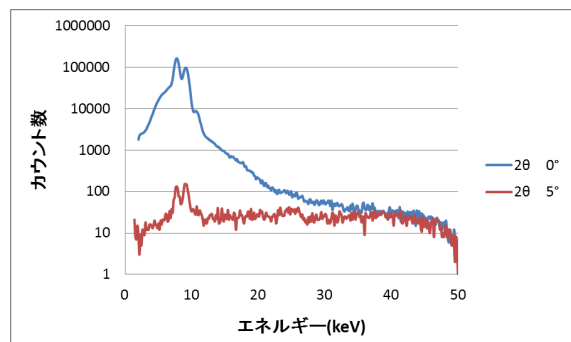


図 4 シリコンウエハの反射強度 (青) とバックグラウンド (赤)

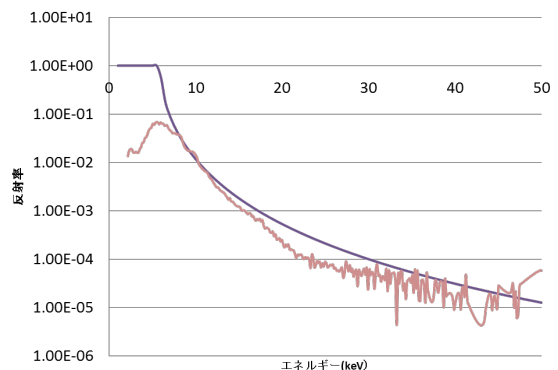


図 5 シリコンウエハの X 線反射率

図 6 水の反射率である。実線はフレネル反射率である。理論に良く一致している。 $10^{-5}$  ま

での測定が可能であることがわかった。

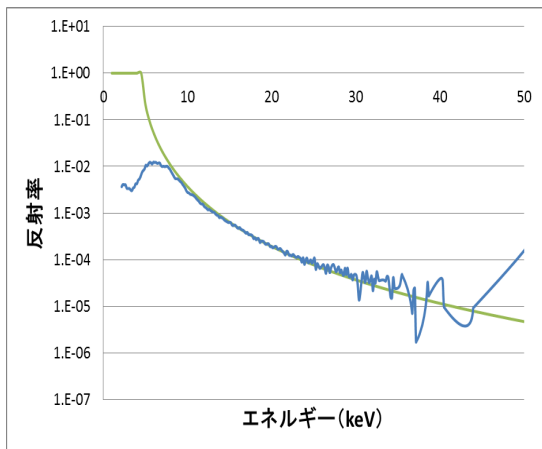


図 6 水の反射率

次に導電性薄膜 (ITO) の反射率測定を行ったところ、図 7 のようなフリンジが観測された。フリンジの間隔から求めた膜厚は  $18 \pm 1$  nm であった。また、このフリンジは測定時間 10 秒でも観測された。

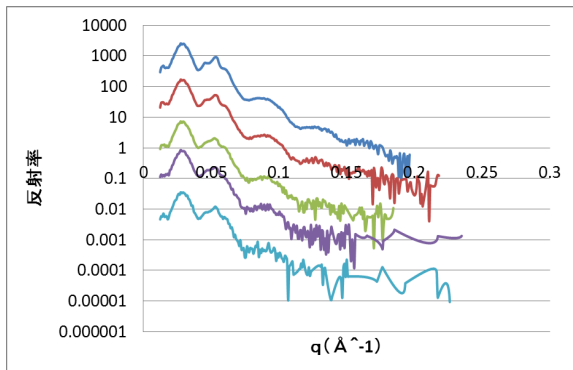


図 7 ITO/ソーダガラス界面の X 線反射率測定時間比較 (上から 1 時間、10 分、1 分、30 秒、10 秒)

### (3) X 線回折/FT-IR 同時測定

図 8 に製作した ED-XRR 装置に既存の全反射赤外分光装置 (ATR-FTIR) を組み合わせた写真を示す。



図 8 ED-XRR/ATR-FTIR システム

この装置を用いて、飽和グリシン水溶液の水が蒸発する過程の時分割測定を行った。ATR のプリズムの上に溶液 0.02mL を載せ、ED-XRR の  $\alpha = \beta = 0.3^\circ$ ,  $2\theta = 10^\circ$  に設定して

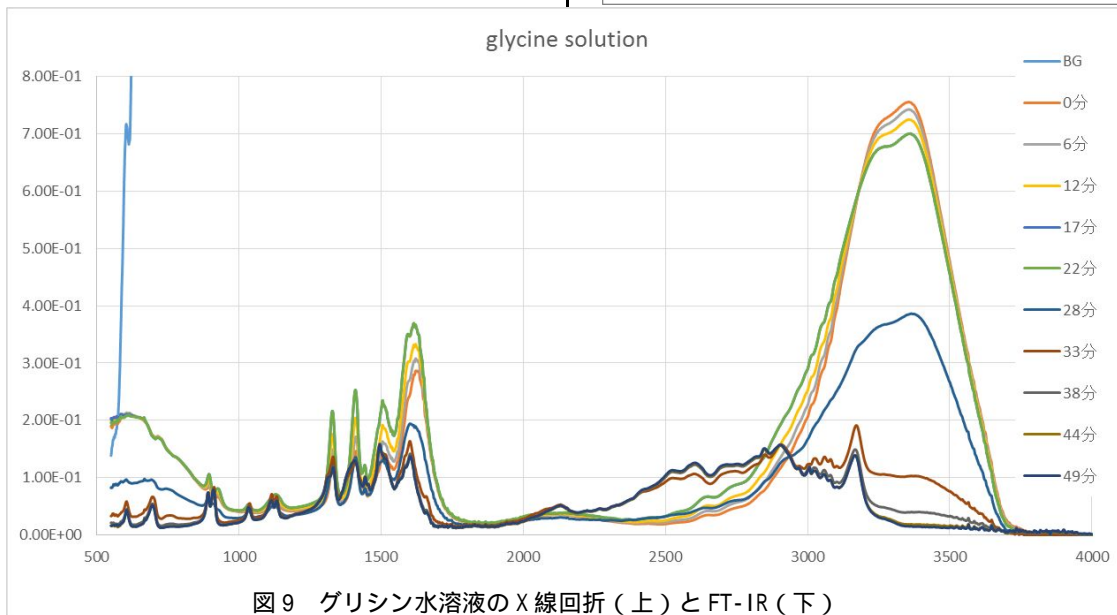
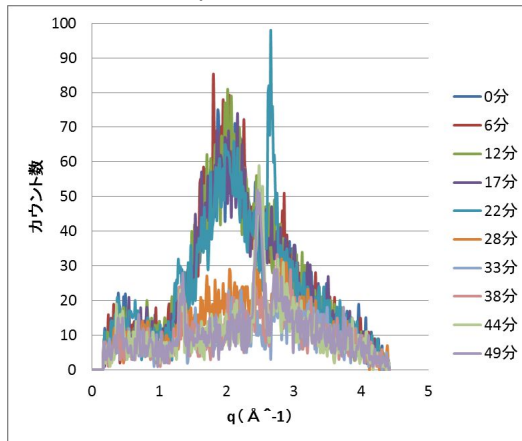


図 9 グリシン水溶液の X 線回折 (上) と FT-IR (下)

X線回折強度を測定した。測定時間は5分とした。同時に、FT-IR(スキャン回数 100、分解能  $4\text{ cm}^{-1}$ )測定を行った。1回の測定にかかる時間は2.5分であった。

結果を図9に示す。初めX線回折パターンは、 $q = 2$  および  $3\text{Å}^{-1}$  にブロードなピークを持つ水の回折パターンと一致したが、経過時間 22 分でブラッグピークが現れた。このとき、FT-IR は、 $3000\text{ cm}^{-1}$  付近の水のバンド強度が減少し、 $1500\text{ cm}^{-1}$  付近のグリシンのバンドが増加した。ところが、28 分後に一旦ブラッグピークは消失し、38 分後に別の位置にピークを生じた。このとき、FT-IR の水のバンドも消失していた。このことより、22 分後では水溶液中に結晶核が生成したが、動く

ことによって一旦ブラッグピークが消失してしまっ。しかし、38 分後に水分が無くなり、粉末結晶によるブラッグピークが現れたと解釈することができる。

#### (4) FT-IR 測定によるタンパク質の塩析現象の観測

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て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

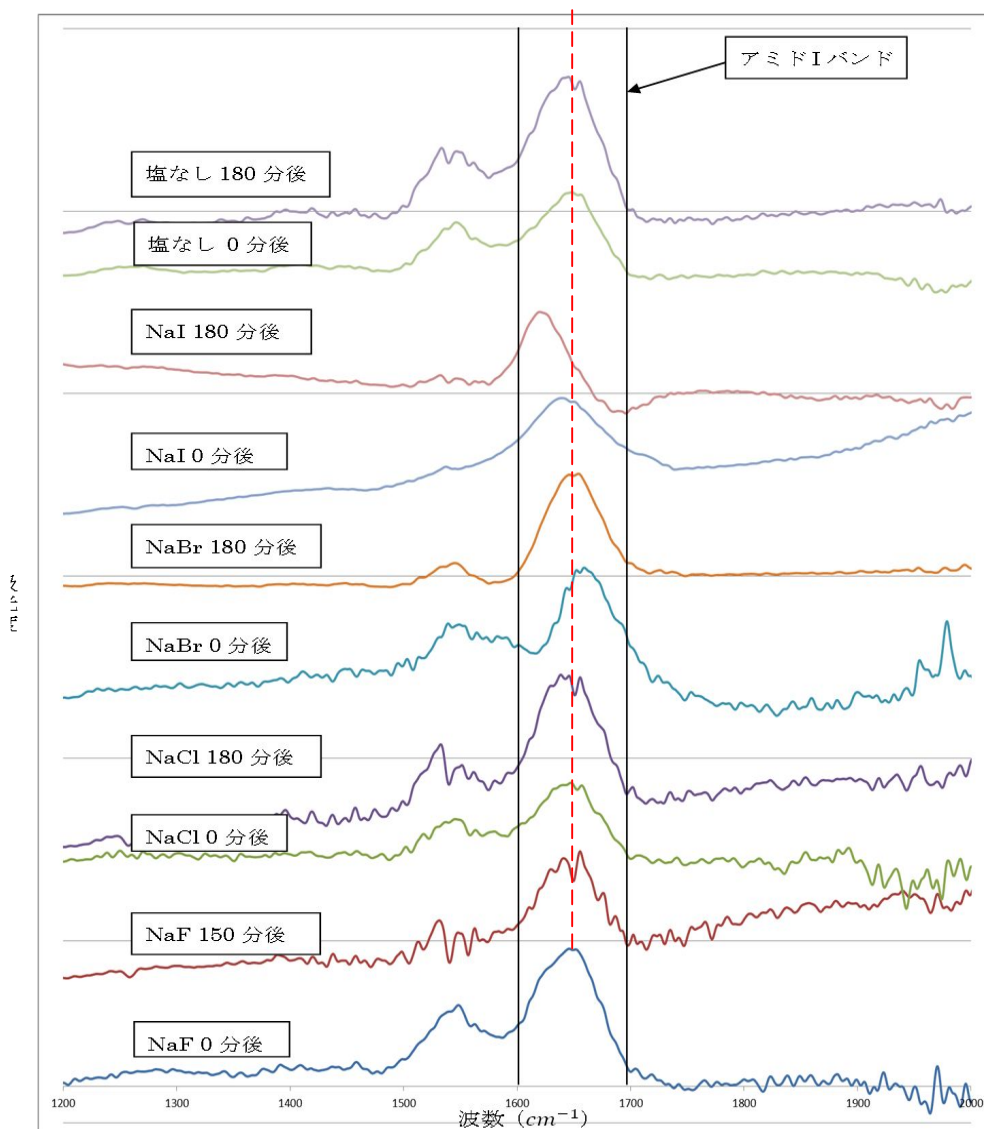
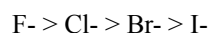


図 10 塩析過程におけるリゾチームのアミド I バンド

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。イオンによる塩析効果は、古くからホフマイスター系列として知られており、例えば陰イオンにおいては



の順にタンパク質が凝析しやすくなる。そこで本研究では、タンパク質の塩析過程について FT-IR を用いて観測した。

pH7, 1M の NaX (X = F-, Cl-, Br-, I-) リン酸緩衝溶液中に、1mg/mL になるようにリゾチームを混合した時刻を 0 分とした。図 10 に IR スペクトルの時間変化を示す。NaI の場合、180 分後には、ピークが低波数側にシフトしており、リゾチームが I- と結合して変性したことが伺われる。

#### (5) まとめと今後の課題

本研究では、新たに実験室の白色 X 線を用いたエネルギー分散型 X 線反射率測定装置 (ED-XRR) を製作し、それを現有の全反射赤外分光装置 (ATR-FTIR、サーモフィッシャー製 Nicolet iS5 FT-IR) と組み合わせ、液体/プリズム界面の構造をリアルタイムで検出するシステムを開発した。

ED-XRR 装置を用いて  $10^{-5}$  までの X 線反射率測定が可能であることがわかった。また測定時間 10 秒で、膜厚を求めるためのデータが取得することができた。また、5 分で X 線回折パターンも測定可能であることがわかった。そこで FT-IR と組み合わせ、グリシン水溶液の同時測定も行うことができた。

また、タンパク質と塩の相互作用について、FT-IR 単独測定による 2 次構造の追跡にも成功したが、ED-XRR との同時測定はできなかった。その理由として、ATR-FTIR のダイヤモンドプリズムを保持するステンレス板が研磨面でなかったことが挙げられる。反射率を測定するには、X 線照射領域が nm オーダーで平坦である必要があるため、今後実現するためには、プリズムを特注する

必要がある。しかしながら、現段階では X 線回折との同時測定は可能であり、応用範囲は非常に広いと思われる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

国際学会・研究会講演

3. Y. F. Yano, K. Nitta, and T. Uruga: "Protein Salting out Observed at an Air-water Interface" 33rd International Conference on Solution Chemistry, Kyoto, Japan [7-12 July, 2013]

国内学会・研究会講演

1. 矢野陽子: "X 線反射率法によるタンパク質の界面アンフォールディング現象の研究 (招待講演)" 理工学部講演会、関西学院大学[15 Nov. 2013]
2. 矢野陽子, 新田清文, 宇留賀朋哉: "液体表面で見られるタンパク質の塩析現象 (4)(口頭発表)" 溶液化学シンポジウム、北海道大学[9 Oct. 2013]

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://qube.phys.kindai.ac.jp/users/yano/index.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

矢野 陽子 (藤原 陽子) (YANO Yohko)  
近畿大学・理工学部・准教授

研究者番号: 70255264

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし