

ポリビニルアルコールハイドロゲルで固定化した紫膜の小角 X 線散乱 Small-angle X-ray scattering of purple membranes immobilized with poly(vinyl alcohol) hydrogel

横山泰範^{1,*}, 田中輝¹, 矢野俊介¹, 高橋浩², 園山正史³, 竹中康司¹

¹名古屋大学 大学院工学研究科 応用物理学専攻, 〒464-8603 名古屋市千種区不老町

²群馬大学 大学院理工学府 理工学基盤部門, 〒371-8510 前橋市荒牧町 4-2

³群馬大学 大学院理工学府 分子科学部門, 〒376-8515 桐生市天神町 1-5-1

Yasunori Yokoyama^{1,*}, Hikaru Tanaka¹, Shunsuke Yano¹, Hiroshi Takahashi², Masashi Sonoyama³ and Koshi Takenaka¹

¹Department of Applied Physics, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8603, Japan

²Division of Pure and Applied Science, Graduate School of Science and Technology, Gunma University, 4-2 Aramaki-cho, Maebashi, 371-8510, Japan

³Division of Molecular Science, Graduate School of Science and Technology, Gunma University, 1-5-1 Tenjin-cho, Kiryu, 376-8515, Japan

1 はじめに

タンパク質の様々な優れた機能の工学応用を試みる際、タンパク質の天然型構造が周囲の環境に極めて鋭敏であるため、構造・機能性を保持した上での固体試料化技術が欠かせない。同時に応用のためには、外部刺激に対して応答でき、かつ高い構造安定性を持つタンパク質が大きなアドバンテージを持つ。したがって、光に対して応答し^[1]、かつ約 100 °C までその構造が保持される^[2]光受容タンパク質バクテリオロドプシン(bR)に対して応用が試みられてきた。

既存の bR の工業応用例としては、その光電的・フォトクロミックな性質を利用した光センサー・光変調素子・光メモリ等^[3,4]がある。一方我々は、それらとは全く異なる動作原理による光記録デバイスへの応用に取り組んでいる。bR は天然で自己組織化し、bR 3 量体の 6 方格子 (格子定数: 6.27 nm^[5]) からなる 2 次元結晶 (紫膜として知られる) を形成する。この結晶中では bR に対する可視光照射により一連の反応 (光サイクル) が誘起され、結果として 1 つの光子の吸収により 1 つのプロトンがポンプされる^[6]。一方、2 次元結晶が融解した条件下において bR を光励起すると、タンパク質の構造変化を伴う不可逆な色素退色が起こることを我々は見出してきた^[7-9]。この色素退色は可視域において 200 nm もの大きな青方転移を伴うため、色素が紫から黄色に変わる。また、人工リン脂質膜への再構成系を用いれば、bR 結晶性を温度により制御可能であることから、光誘起の不可逆な色素変化を温度で自由にコントロールできる^[9]。さらに、この青方転移した色素を青色光で励起すると、元の色素状態に部分的にはあるが (70 %程度) 再生するので^[10]、不揮発性のランダムアクセスメモリへの応用が期待される。bR 機能機構解明のためには変性や色素退色は好ま

しくなく無視されるが、我々はこの現象を積極的に捉え、光照射した部位のみを変色させ「光で書込む・消去する」新規デバイスへの応用を着想した。

bR の機能性は周囲の水分量に敏感であるので^[11]、我々は固定化媒体として親水性高分子のつくるハイドロゲルに着目した。その中でもポリビニルアルコール(PVA)ハイドロゲルは、凍結-融解(FT)法により物理架橋 (水素結合) ゲルを形成できる^[12]。我々は紫膜懸濁液を PVA 溶液中と混合し、凍結-融解を繰り返すことによりゲル化させ固体試料を作製した。この固体試料中の紫膜中の bR 結晶性を可視円 2 色性分光測定により検討したところ、FT サイクルの進行とともに膜の積層^[13]を示唆する結果が得られた。今回、PVA 中の紫膜試料に対して小角 X 線散乱 (SAXS)を測定し、この FT 法で作製した PVA 高分子ゲル中で起こる紫膜の積層機構の解明を試みた。

2 実験

SAXS 測定は、高エネルギー加速器研究機構・フotonファクトリー・BL-6A において行った。X 線の波長は 0.15 nm、カメラ長は約 90 cm であり、ベヘン酸銀の散乱パターンにより回折角ならびにカメラ長の較正を行った。X 線散乱パターンは、検出器に Dectris 社製の PILATUS3 1M を用いて露光時間 300 s にて記録した。溶液状の試料は Hilgenberg 社製のマークチューブ No. 10 (外径: 1 mm,肉厚: 10 μm) 中に封入し、ゲル状の試料は 1 mm 厚のテフロンスペーサーとともに 2 枚の熔融石英窓板 (厚さ: 100 μm) で挟んで作製したセルを用いて測定した。

3 結果および考察

図 1 に、紫膜/PVA 溶液試料(a)、紫膜/PVA 固体試料(b)、ならびに紫膜懸濁液試料(c)の SAXS プロファ

イルを示す。試料に X 線を垂直入射して得られた散乱像はいずれもパウダーパターンであり、円周積算した結果を $1/d$ を横軸にして表示した。この一連の測定により、紫膜懸濁液試料や PVA 試料単独では見られなかった特徴的なピークが紫膜/PVA 溶液試料において観測された。このピークの周期は約 20 nm であるが、既知の 2 次元結晶の周期^[1]と比較して明らかに長いこと、また PVA 濃度を保ちながら紫膜濃度を薄めた測定においてさらに長周期化したことから、紫膜と PVA 鎖の相互作用の結果形成される紫膜間の規則構造を反映しているものと考えられる。

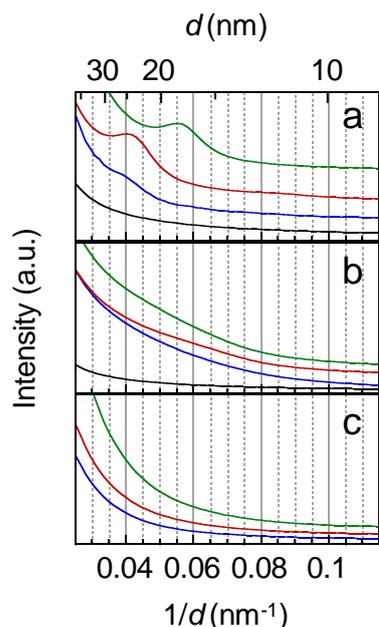


図 1: 紫膜試料の SAXS プロファイル; (a) PVA 溶液中(FT 処理なし), (b) PVA 固体試料中(FT 処理 5 回), (c) 懸濁液試料中。黒: PVA, 青: [bR] = 125 μ M, 赤: [bR] = 250 μ M, 緑: [bR] = 500 μ M。PVA 濃度は全て 5 wt%。

一方興味深いことに、FT 処理を 5 回繰り返した紫膜/PVA 固体試料において、この長周期構造は不明瞭になった(図 1b)。この結果から、PVA 固体試料中における紫膜間の規則構造に関して 2 つの可能性が示唆された。(1) ゲル構造形成の過程で紫膜の等方的な規則構造自体が消失した。(2) 等方的な規則構造が異方的に変化した。この点について、可視円 2 色性の結果と矛盾しない解釈を考えると、PVA ゲル構造形成過程において紫膜がセル表面に平行に積層する描像の他に合理的な解釈は存在しない。

FT 法により形成される PVA ハイドロゲルの形成機構とともに、紫膜積層機構について考察を行う。FT 法で作製された PVA ゲルネットワークは、直径 ~ 10 μ m の多孔質構造を持つ^[14]。この多孔質構造は FT サイクルの進行とともに形成され、その間に紫

膜は次第に周囲を取り囲まれて行くことが考えられる。PVA の多孔質構造中で、紫膜は何らかの機構により系全体で積層することが考えられる。紫膜の表と裏で荷電アミノ酸の分布が異なるため、狭い空間の中でお互いに静電斥力を避けるように膜が再配置する可能性もあるが、どのような物理化学的な要因により積層するのか、今後検討を続ける予定である。

4 まとめ

紫膜/PVA 溶液ならびに紫膜/PVA 固体試料に対する SAXS 測定を通じて、PVA ゲル内での紫膜の構造に関する検討を行った。紫膜/PVA 溶液では約 20 nm の紫膜間の規則構造が形成されたが、ゲル化の進行とともにこの規則構造が異方的に変化した。ゲル形成に伴う紫膜の積層モデルが提案された。

謝辞

光学系や検出器のセッティングについて、KEK-PF 小角散乱ビームラインスタッフの皆様ならびに五十嵐教之教授と清水伸隆教授に多大なご協力を頂きましたことを、ここに感謝いたします。本研究の一部は、日本学術振興会・科学研究費補助金・基盤研究(C)(26390046)の助成により行われた。

参考文献

- [1] D. Oesterhelt & W. Stoerkenius, *Nat. New Biol.* **233**, 149 (1971).
- [2] M. B. Jackson & J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **17**, 911 (1978).
- [3] R. R. Birge, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **41**, 683 (1990).
- [4] T. Miyasaka et al, *Science* **255**, 342 (1992).
- [5] R. Henderson, *J. Mol. Biol.* **93**, 123 (1975).
- [6] J. K. Lanyi, *Annu. Rev. Physiol.* **66**, 665 (2004).
- [7] Y. Yokoyama et al, *Proteins* **54**, 442 (2004).
- [8] Y. Yokoyama et al, *Photochem. Photobiol.* **86**, 297 (2010).
- [9] Y. Yokoyama et al, *J. Phys. Chem. B* **114**, 15706 (2010).
- [10] Z. Dancsházy & Z. Tokaji, *FEBS Lett.* **476**, 171 (2000).
- [11] R. Korenstein & B. Hess, *Nature* **270**, 184 (1977).
- [12] N. A. Peppas & S. R. Stauffer, *J. Controlled Release* **16**, 305 (1991).
- [13] D. D. Muccio & J. Y. Cassim, *Biophys. J.* **26**, 427 (1979).
- [14] F. Yokoyama et al, *Colloid Polym. Sci.* **264**, 595 (1986).

成果

1. Y. Yokoyama, H. Tanaka, S. Yano, H. Takahashi, T. Kikukawa, M. Sonoyama, and K. Takenaka, Spontaneous stacking of purple membranes during immobilization with physical cross-linked poly(vinyl alcohol) hydrogel with retaining native-like functionality of bacteriorhodopsin, *J. Appl. Phys.* **121**, 204701, 2017.

* yokoyama@nuap.nagoya-u.ac.jp