

小角 X 線散乱によるポリビニルアルコール溶液中の紫膜周期構造形成機構 Periodic structural formation mechanisms of purple membranes in poly(vinyl alcohol) solution studied by small-angle X-ray scattering

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

¹名古屋大学 大学院工学研究科 応用物理学専攻, 〒464-8603 愛知県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 群馬県前橋市荒牧町 4-2

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

Yasunori YOKOYAMA^{1,*}, Shunsuke YANO¹, Riku KURITA¹, Koshi TAKENAKA¹, Hiroshi TAKAHASHI² and Masashi SONOYAMA³

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, Kiryuu, 376-8515, Japan

1 はじめに

生命のナノマシン・タンパク質の優れた機能を応用する際最も障壁となるのが、機能の根源となるタンパク質天然型構造が周囲の環境変化に極めて敏感であるので、容易に変性しその機能を失ってしまうことである。そのため、機能性と安定性を高度に両立したタンパク質の利用と適切な固定化技術が必須となる。我々はこれまでに、光に応答し^[1]、かつ約 100 °C までその構造が保持される^[2]光受容膜タンパク質バクテリオロドプシン(bR)に対して、結晶性と機能時の構造安定性の関係^[3,4]を利用した新しい光記録素子への応用に取り組んできた。

タンパク質のデバイス利用のためには、その存在環境を溶液系から固体系へ転換する必要がある。「大量の水分を含んだまま固化する」と言う方針のもと、我々は親水性高分子によるハイドロゲルによる固定に注目した。その中で、タンパク質へのダメージのリスクを極力回避するため、架橋剤なし・室温以下の条件下でもゲル化可能なポリビニルアルコール(PVA)の凍結・融解法^[5]を選択し、紫膜(bR)の2次元結晶の平面膜)の固定を試みた。その結果、ゲル中の bR の光応答性は溶液中とほぼ同等であり、天然様の機能性を保持した状態での固定に成功した^[6]。さらに、PVA 中での紫膜構造について興味深い結果が得られた。つまり、紫膜は PVA 溶液中に展開しただけで約 20 nm の周期構造を形成し、さらに凍結・融解サイクルの繰返しによる紫膜の自発的積層が小角 X 線散乱(SAXS)実験より示唆された^[6]。

紫膜は bR の 2 次元結晶であるため、ゲル中での紫膜積層は bR の色素レチナルの整列を意味する。積層は光記録素子の光励起条件の均一化、高密度記録化などに有利であり、積層機構の理解は応用のために必須となる。円 2 色性の結果は PVA 溶液中での

紫膜間の周期構造と PVA ゲル中での紫膜積層の関係を強く示唆するので^[6]、今回 PVA 溶液中での紫膜周期構造形成機構を解明するため紫膜/PVA 溶液の SAXS 測定における PVA 濃度依存性を検討した。

2 実験

SAXS 測定は高エネルギー加速器研究機構・フォトンファクトリー・BL-6A にて行った。X 線の波長は 0.15 nm、カメラ長は標準で約 0.9 m としたが、必要に応じて約 1.4 m に変更した。各測定条件においてベヘン酸銀の散乱パターンを測定し、回折角ならびにカメラ長の較正を行った。紫膜/PVA 溶液試料はガラス製のキャピラリー管(Hilgenberg 社, Mark Tube No. 10 (外径: 1 mm, 肉厚: 10 μm)) に封入し、X 線散乱パターンは検出器にハイブリッドピクセル検出器(Dectris 社, PILATUS3 1M)を用いて、露光時間 60 s、温度 25 °C にて測定を行った。

3 結果および考察

図 1 に、紫膜/PVA 溶液試料の SAXS プロファイルを示す。紫膜濃度は一定で([bR] = 500 μM)、PVA 濃度は図中に示している。散乱像はいずれもパウダーパターンであり、円周積算した散乱光強度を横軸 $1/d$ に対してプロットしている。PVA 濃度増加に従い、小角領域に現れたピーク位置が広角側にシフトした。この SAXS ピークの構造周期を求めるため、各 SAXS プロファイルのベースラインをべき乗の関数でフィッティングし決定した。ベースライン補正後のピーク位置から求めた構造周期 d を PVA 濃度に対してプロットしたものをインセットに示す。先行研究^[6]で初めて報告された紫膜間の約 20 nm の構造周期は、PVA 濃度 1~10 wt% の範囲において約 30 ~ 15 nm まで変化することが示された。この結果は、

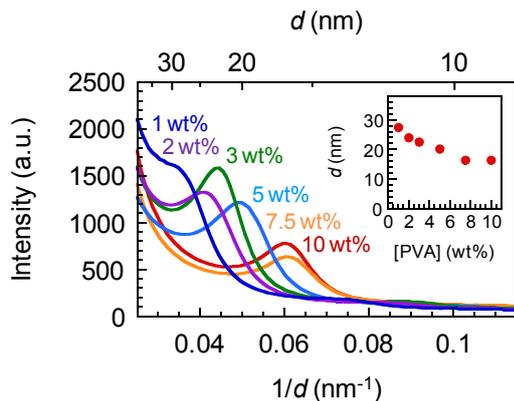


図1：紫膜/PVA 溶液試料の小角 X 線散乱プロファイル。[bR] = 500 μ M。インセットは紫膜間距離の PVA 濃度依存性。

PVA は紫膜間の引力相互作用に関与し、また PVA 濃度の増加に伴いこの引力は強くなることを示す。現時点ではこの引力の起源は不明なため、PVA 以外のゲル媒体や高分子の作用を検討する予定である。

一方、紫膜間の周期構造は引力相互作用だけでは溶液中において形成することはできず、斥力相互作用が必ず同時に働かなければならない。斥力を及ぼす原因として、bR の等電点付近で紫膜が凝集し沈殿することからも、紫膜表面の負電荷アミノ酸がまず第一に疑われる。そこで、紫膜規則構造形成に対する静電斥力の寄与を、塩添加による静電遮蔽を通じて検討した。静電相互作用の及ぶ距離（デバイ長; $1/\kappa$) は、次のように示される。

$$\frac{1}{\kappa} = \sqrt{\frac{\epsilon_0 k_B T}{\sum_i \rho_i e^2 z_i^2}} \quad (1)$$

ここで、 ϵ : 比誘電率, ϵ_0 : 真空の誘電率, k_B : ボルツマン定数, T : 温度, ρ_i : イオン i の濃度, e : 電気素量, z_i : イオン i の価数である。今回、紫膜/PVA 溶液中に価数の異なる NaCl および CaCl_2 を添加して SAXS 測定を行った。図 2 に、各塩濃度条件から求めたデバイ長 $1/\kappa$ に対して、SAXS ピーク位置から得られた周期 d をプロットした。その結果、観測された周期 d は添加した塩の価数に依らずデバイ長に比例して増加した。つまり、静電斥力の及ぶ距離が長くなるにつれ膜間距離が増加したことから、紫膜間周期構造における静電斥力相互作用の寄与が強く示された。また、この周期構造は $[\text{NaCl}] \geq 500 \text{ mM}$, $[\text{CaCl}_2] \geq 50 \text{ mM}$ で完全に消失しており、デバイ長 0.79 nm 以下では周期構造の形成が阻害される結果となった。

4 まとめ

本研究により、紫膜/PVA 溶液中に形成される紫膜間周期構造は、紫膜と PVA の相互作用の結果生

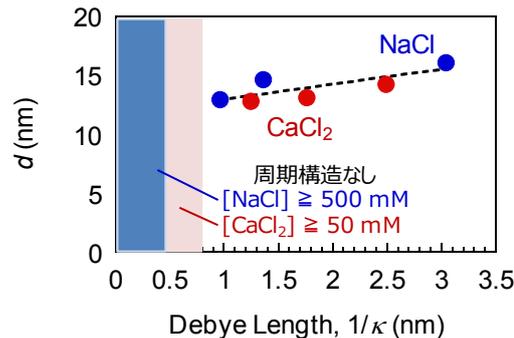


図2：紫膜/PVA 溶液中での紫膜間構造周期に対する塩添加の効果。[bR] = 500 μ M。

じる引力相互作用と、紫膜表面間の静電斥力相互作用のバランスの上に成立していることが強く示された。今後は引力相互作用の起源について検討する。

謝辞

光学系・検出器のセッティングなど、KEK-PF 小角 X 線散乱ビームラインスタッフの皆さまならびに、五十嵐教之准教授と清水伸隆准教授に多大なご協力を頂きました。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, 17K05931) の助成により行われた。

参考文献

- [1] D. Oesterhelt & W. Stoekenis, *Nat. New Biol.* **233**, 149 (1971).
- [2] M. B. Jackson & J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **17**, 911 (1978).
- [3] Y. Yokoyama et al, *Proteins* **54**, 442 (2004).
- [4] Y. Yokoyama et al, *J. Phys. Chem. B* **114**, 15706 (2010).
- [5] N. A. Peppas & S. R. Stauffer, *J. Controlled Release* **16**, 305 (1991).
- [6] Y. Yokoyama et al, *J. Appl. Phys.* **121**, 204701 (2017).

成果

1. Y. Yokoyama, H. Tanaka, S. Yano, R. Kurita, K. Takenaka, H. Takahashi, T. Kikukawa and M. Sonoyama, Spontaneous stacking of purple membranes during immobilization with physical cross-linked poly(vinyl alcohol) hydrogel with retaining native-like functionality of bacteriorhodopsin, 14th International Conference on Flow Dynamics (2017.11) [Invited].
2. S. Yano, H. Tanaka, Y. Yokoyama, H. Takahashi, M. Sonoyama, T. Kikukawa and K. Takenaka, Comparative study on purple membrane stacking and bacteriorhodopsin functionality in immobilized samples with various hydrogels, 55th Annual Meeting of Biophysical Society of Japan (2017.9).

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