

高分子溶液中で形成される紫膜周期構造に対する小角 X 線散乱 Periodic Structure of Purple Membranes in Polymer Solutions Studied by Small-Angle X-Ray Scattering

横山泰範^{1,*}, 栗田陸¹, 柄澤森瀬¹, 竹中康司¹, 高橋浩², 園山正史^{3,4,5}

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

⁴群馬大学 未来先端研究機構, 〒371-8515 前橋市昭和町 3-39-22

⁵群馬大学 食健康学教育研究センター, 〒371-8510 前橋市荒牧町 4-2

Yasunori YOKOYAMA^{1,*}, Riku KURITA¹, Morise KARASAWA¹, Koshi TAKENAKA¹,
Hiroshi TAKAHASHI², and Masashi SONOYAMA^{3,4,5}

¹Dept. Appl. Phys., Nagoya Univ., Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8603, Japan

²Div. Pure & Appl. Sci., Gunma Univ., 4-2 Aramaki-cho, Maebashi, 371-8510, Japan

³Div. Mol. Sci., Gunma Univ., 1-5-1 Tenjin-cho, Kiryu, 376-8510, Japan

⁴GIAR, Gunma Univ., 3-39-22 Shouwa-cho, Maebashi, 371-8515, Japan

⁵GUCFW, Gunma Univ., 4-2 Aramaki-cho, Maebashi, 371-8510, Japan

1 はじめに

生命の分子機械・タンパク質を工業的に応用するためには、機能の根源となるタンパク質天然型構造を保持しつつ、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。タンパク質機能性維持の観点から「大量の水分を含んだまま固化する」という方針に基づき、光機能性膜タンパク質バクテリオロドプシン(bR)が自己組織化してできた紫膜 (bR 3 量体の 2 次元結晶からなる平面膜) の、親水性高分子が形成するハイドロゲル中への固定化を試みてきた。

ハイドロゲルは、媒体中に大量の水分を含有するゲル構造体の総称で、架橋点の結合様式により化学架橋ゲル (架橋剤による高分子鎖間の共有結合) と物理架橋ゲル (高分子鎖間の水素結合) に分類される。一般的に化学架橋ゲルの方が力学特性に優れる半面、架橋剤の非特異的な化学反応によりタンパク質にダメージを与える恐れがある。そのため我々は、架橋剤なし・室温以下の条件下でもゲル作製可能なポリビニルアルコール(PVA)の凍結・融解法^[1]を採用し、固体試料中の bR 機能・構造特性を評価した。

その結果、天然型の bR 光機能性を維持した状態での固定化に成功したのみならず、PVA 中で紫膜が水中では見られない特異な構造を取ることを見出した^[2]。つまり、紫膜を PVA 溶液に懸濁しただけで約 20 nm 周期の紫膜間構造を形成し、ゲル構造の成長とともに紫膜が自発的に積層したことが小角 X 線散乱(SAXS)により示された^[2]。この 20 nm 周期構造は塩添加による静電遮蔽で構造周期が減少し、紫膜表

面間の静電斥力が周期構造形成に関係することが明らかになった。それに対して、紫膜間の引力の起源については不明であった。今回は、紫膜間の周期構造に対する PVA 以外の高分子 (ポリエチレングリコール, PEG) の影響を検討した。

2 実験

SAXS 測定は、高エネルギー加速器研究機構・フオトンファクトリー・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 1.5 m に変更した。それぞれの光学系において、ベヘン酸銀の回折データから回折角・カメラ長の較正を行った。紫膜/PVA 溶液ならびに紫膜/PEG 溶液は、ガラスキャピラリー (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℃にて測定を行った。

3 結果および考察

図 1(a)に、紫膜/PEG 溶液試料の SAXS プロファイルを示す。紫膜濃度は一定で([bR] = 250 μM)、PEG 濃度は図中に示す。散乱像はパウダーパターンであり、円周積算した強度を散乱ベクトル q に対してプロットした。PVA 溶液と比較するとピークが不明瞭であるが、PEG 添加によっても紫膜間の周期構造が出現し、PVA と同様に高分子濃度増加に伴いピーク位置が広角側にシフトした。このピーク位置を、各

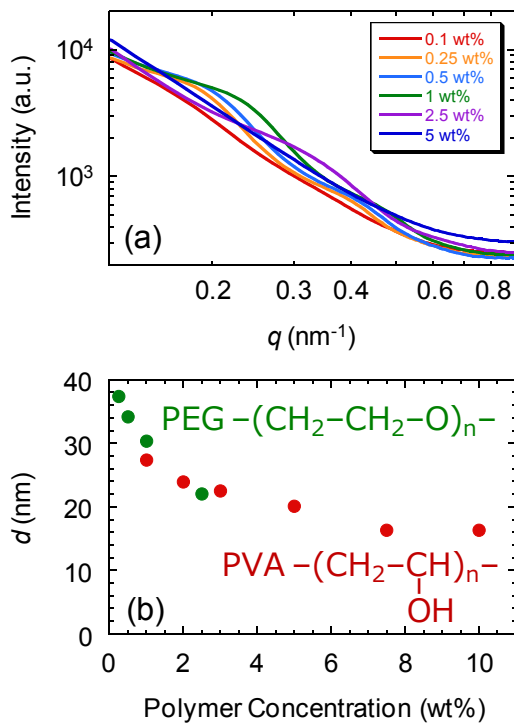


図 1 : (a) 紫膜/PEG 溶液試料の SAXS プロファイル。[bR] = 250 μM 。(b) 紫膜間距離の PEG および PVA 濃度依存性。

プロファイルのべき乗の関数で求めたベースラインを除去して決定し、高分子濃度に対してプロットしたのが図 1(b)である。PEG の結果は PVA のものと良い接続を示し、紫膜間の周期構造形成は紫膜と PVA 間の特異的な相互作用ではなく、高分子とコロイド粒子の間に働くエントロピックな枯渇引力 (朝倉・大沢の力^[3]) であることが強く示唆された。今後は、高分子鎖の慣性半径との関係について、詳細に検討する予定である。

また、紫膜間の周期構造を観測する測定条件を検討する際に、大変興味深い結果が得られたので、今回報告する。キャピラリー管に封入した紫膜/PVA 溶液に対して、露光時間 60 s の測定を 90 分間連続して続けた結果を図 2(a), (b)に示す。図 2(a), 2(b)はそれぞれ紫膜間の周期構造、bR 3 量体の 2 次元格子に由来するピーク領域である。図 2(a), 2(b)ともに、測定時間の経過とともにピークがシフトあるいは減少しているのがわかる。このピークの変化は X 線ダメージによるものであり、今回の露光時間 60 s ではどちらの領域にも X 線ダメージの影響がないことが示された。図 2(c)に、紫膜/PVA 溶液中での紫膜間構造周期と、bR 3 量体の 2 次元格子の(11)ピークの相対強度の X 線照射時間依存性を示す。2 次元格子の(11)ピークについては、比較のため紫膜懸濁液のデータも合わせて示す。図 2(c)を見ると、紫膜/PVA 溶液では、照射開始から 20 分においては、紫膜間の構造周期が増加するものの、bR 3 量体の 2 次元格子

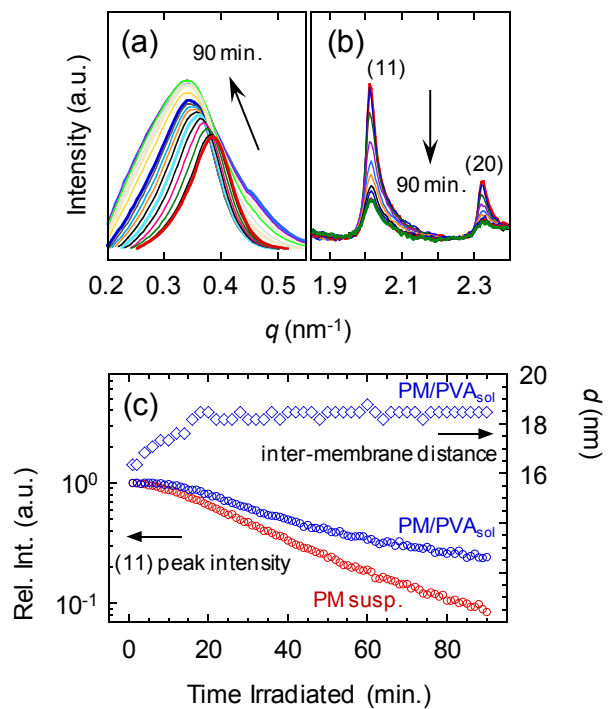


図 2 : 紫膜/PVA 溶液試料の小角 (a) ならびに広角 (b) 領域の SAXS プロファイルの時間変化。[bR] = 500 μM , [PVA] = 7.5 wt%。(c) 紫膜間距離ならびに 2 次元格子の(11)ピークの相対強度の X 線照射時間依存性。

への影響はあまり見られなかった。照射開始から 20 分を過ぎると、膜間周期にそれ以上変化はなく、2 次元格子のピーク減少が顕著になった。一方、高分子の存在しない紫膜懸濁液の場合は、PVA 存在下と比較して早い時間領域から 2 次元格子のピークの減少が始まり、90 分後では PVA 存在下よりもピーク減少幅が大きい結果であった。2 次元格子のピーク減少は、紫膜の X 線ダメージによるものと考えられるので、紫膜/PVA 溶液においては以下のようなことが考えられる。(1) 最初の 20 分は PVA 鎖への損傷が顕著であり、PVA 鎖が切断されることにより高分子鎖の慣性半径が減少し、紫膜間の引力の減少を引き起こした。そのため、紫膜へのダメージは軽微なものにとどまった。(2) 照射後 20 分後以降では、X 線ダメージが紫膜にも及び出した。紫膜懸濁液と比較すると、PVA の存在が紫膜へのダメージ軽減に貢献したと言える。

4 まとめ

紫膜/PEG 溶液の SAXS 測定から、PVA 溶液中で見られた紫膜間の周期構造は PEG 中でも観測された。膜間周期構造は、紫膜と PVA の特異的相互作用の結果起こるものではなく、より一般的な相互作用により生じることがわかった。現時点では高分子中でのコロイド粒子間に働く枯渇効果が疑われる。

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教授と清水伸隆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] N. A. Peppas & S. R. Stauffer, *J. Controlled Release* **16**, 305 (1991).
- [2] Y. Yokoyama et al., *J. Appl. Phys.* **121**, 204701 (2017).
- [3] F. Oosawa & S. Asakura, *J. Chem. Phys.* **22**, 1255 (1954).

成果

1. 横山泰範、矢野俊介、栗田陸、田中輝、竹中康司、高橋浩、菊川峰志、園山正史、ハイドロゲル固体試料中の紫膜積層機構とゲルネットワーク構造、第 45 回生体分子科学討論会、大阪市立大学、2018. 6.22-23.
2. 栗田陸、矢野俊介、横山泰範、竹中康司、高橋浩、園山正史、ハイドロゲル固体試料中の紫膜積層に対する静電遮蔽の効果、第 45 回生体分子科学討論会、大阪市立大学、2018. 6.22-23.
3. 栗田陸、矢野俊介、田中輝、横山泰範、竹中康司、高橋浩、菊川峰志、園山正史、ハイドロゲル固体試料中のバクテリオロドプシンの機能・構造特性、日本物理学会 2018 年秋季大会、同志社大学京田辺キャンパス、2018.9.9-12.

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