

# 微小角入射法を用いた生体・ソフト界面のメゾスケール階層構造解析

田中 求<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ハイデルベルク大学物理化学研究所生命物理化学講座

<sup>2</sup>京都大学物質-細胞統合システム拠点 (WPI iCeMS)

## 1. はじめに一相境界, 反応場としての膜

細胞膜は細胞の内側(細胞質)と外側(細胞外基質)という2つの相の空間的境界を定義するだけでなく, 数多くの膜関連タンパク質や糖鎖といった分子を介して, 外部環境(もしくは隣り合った細胞)との相互作用を制御したり, 選択的フィルターとして必要なものの取り込みと不要なものの排出を司ったりと, 多くの重要な生化学反応の反応場として機能する. 物理学の観点から見ると, 細胞膜は厚さが5 nm, 広さが数100  $\mu\text{m}^2$  という, 準2次元的な**複雑液体**と定義することができる.

なぜ自然は2次元界面を反応場として使っているのか? という問いには, 古典的なSmoluchowskiの凝固方程式を用いて答えることができる. 自由拡散している粒子が, 他の粒子と衝突するまでの拡散時間を粒子半径 $x$ の関数で計算すると, バルク(3次元)では $1/x$ に比例するのに対し, 膜(2次元)では $-\ln(x)$ に比例する<sup>1)</sup>. このことから, 反応に必要な衝突が分子のサイズに大きく影響されない, 2次元の膜を反応場とすることが自然にとって「経済的」であることが理解できる.

## 2. 膜の深さ方向のメゾスコピック構造

細胞が実際に外部因子(環境因子, ケモカイン, 薬剤, 移植材料など)と出会うのは, 細胞膜という柔らかい界面であり, その相互作用は膜面に垂直な方向に数10 nmまでの深さに及ぶ. この30年近く, 細胞膜である脂質膜や水和したポリマーブラシといった界面のメゾスコピック階層構造を明らかにする実験手法として, ソフトマター物理の分野では気液界面での量子ビーム(X線・中性子)を用いた鏡面反射率測定が広

く用いられてきた. ここではサンプル面で反射した単色光の強度を $\alpha_f = 2\alpha_i$  ( $\alpha_i$ : 入射角,  $\alpha_f$ : 射出角)の条件で測定するもので, 運動量の移行は膜面に垂直な要素 $q_z$ のみである. 運動学的モデルの枠組みにおいて, 粗い多層界面の反射率は, 平滑なFresnel反射係数漸近スケーリングと散乱長密度 $\rho$ のフーリエ変換によって

$$R(q_z) = \frac{I}{I_0} \propto q_z^{-4} \left| \int_{-\infty}^{\infty} \frac{d\rho}{dz} \exp(-iq_z z) dz \right|^2$$

と表される. X線鏡面反射法(Specular X-ray Reflectivity, XRR, 図1)は, サブÅレベルの精密さで気液界面から50 nm位までの微小構造を明らかにするのに非常に有効な手法で, 中性子や, 近年報告されたように高エネルギーX線( $E \geq 20$  keV)を用いることにより固液界面の平面基板に支持された細胞膜モデルにも応用できる<sup>2), 3)</sup>. 一方, X線鏡面反射の弱点としては(1)実験に時間がかかりサンプルにダメージを与えることがある, (2)得られる構造情報がフットプリント

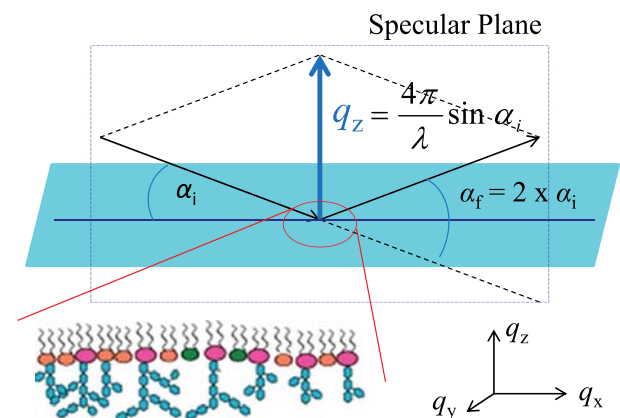


図1 気液界面での鏡面反射(XRR)の模式図.

(照射面積)の中で平均化されたアンサンブルの情報である、そして(3)反射率から計算される散乱長密度(X線の場合は電子密度がよく使われる)は、元素に選択的ではない総合的な情報しか得られない、といった点が挙げられる。照射によるダメージを防ぐ手法としては、中性子の使用が考えられるがビームの強度が弱だけでなく、空間分解能が劣る、大きなサンプルが必要であるなどと制約も多い。

これらの弱点を克服する1つの可能性として、微小入射角X線小角散乱(GISAXS)を応用して、Specular planeからすこし外れた位置( $q_y \sim 0.03 \text{ \AA}^{-1}$ )で散乱強度を測定する手法が提唱された<sup>4)</sup>。厚さが一様で粗い多層構造においては、検出された散乱シグナル強度 $I(q_z)$ と対応する鏡面反射率 $R(q_z)$ の関係は(界面粗さのない)理想的な系のFresnel反射率 $R_F(q_z)$ と、透過率(Vineyard関数) $T$ を用いて

$$I(q_z) \propto |T|^2 \frac{R(q_z)}{R_F(q_z)}$$

のように表せるので、これから反射率の公式を用いて散乱長密度の分布を計算することができる。この手法を用いれば、1つの入射角での測定で鏡面反射に対応する情報を得られるため、2-3時間かかっていた測定を2分程度に短縮でき、生体由来サンプルの照射ダメージを最小化することができる<sup>5)</sup>。

### 3. 物理学からの挑戦・ソフト界面の静電気学

細胞の表面は負に荷電した糖鎖複合体(例・動物細胞表面のシアル酸やグラム陰性菌表面のリポ糖脂質)によって覆われており、これがクッションのように細胞本体の構造安定性に寄与したり、非特異的なタンパク質・細胞の接着を防いだりするだけでなく、糖結合タンパク質や他の糖鎖物質に選択的に認識されたりしている。食品の保存などに用いられる抗微生物性ペプチドなどの例を挙げるまでもなく、膜と外部因子の相互作用を考える上で、膜表面での静電相互作用は、避けて通れない問題である。その中でも多価のイオンによって生じる、イオン特異性の相互作用は、これまでに生物物理学だけでなくコロイド・界面の科学の分野でも多く報告されてきた。

細胞表面の静電気学を考える上で、考慮しなければならないのは、イオンの分布や荷電高分子のコンフォメーションは決して均一でもなければ定常状態にもないということである。すなわち、古典的なDLVO理論の枠組みではこのような系を記述できない。このように構造揺らぎを含んだ非結晶性の系を記述する理論

モデルのツールを選択する上で重要なのは、時空間のスケールである。数百から数千の分子を含むメゾスコピックな空間で、高分子の構造揺らぎのミリ秒単位までの時間枠をカバーするには、分子動力学の応用は困難であり、疎視化したモデルと線形ポアソン・ボルツマン理論の組み合わせなどを用いることが必要となる。

実験的な側面を考えるならば、古典的な分光法では「1価と2価のイオンの空間分布を見分ける」「カリウムイオンとセシウムイオンを見分ける」という要求に答えられないため、新しい分光学的手法の開拓が必須である。その1つの試みが微小入射角X線蛍光法(GIXF)である(図2)。

ここではGISAXSと同様、微小入射角で気液界面の膜を照射するが、ビームのフットプリント上に蛍光検出器を設置して、各元素からのX線蛍光(例・カリウム $K\alpha$ 準位)を検出する点が異なる。全反射臨界面をはさんだ領域で入射角 $\alpha$ を調節することにより、エバネッセント場の貫入深度 $\Lambda$ を変えることができる。つまり、界面近傍での励起体積を精密に制御することによって、深さに依存した目的元素それぞれの蛍光強度が求められるのである。蛍光強度 $I^{flu}$ と元素のある深さ $z$ における表面濃度 $c(z)$ は、

$$I^{flu}(\alpha) \sim \int_0^{\infty} I^{ill}(z, \alpha) c(z) \exp(-z/L) dz$$

の関係にあるので、多層界面で反射・屈折する電磁波の強度 $I^{ill}$ を定量できれば( $L$ は元素特有の減衰長)、特定の元素の深さ方向の濃度分布を計算できる(図3)。

ここで忘れてはならないのは、薄膜中を伝播する電磁波の強度は膜の電子構造に強く支配されるということである。すなわち、GIXFの定量解析には鏡面反射やGISAXSによる電子密度(散乱長密度)分布の計測が不可欠である、ということである。

この手法は、「グラム陰性菌変異体から抽出したり

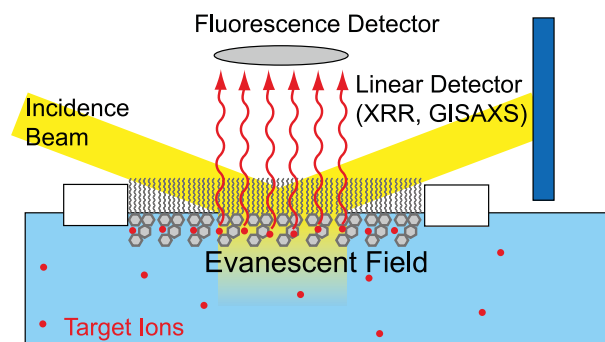
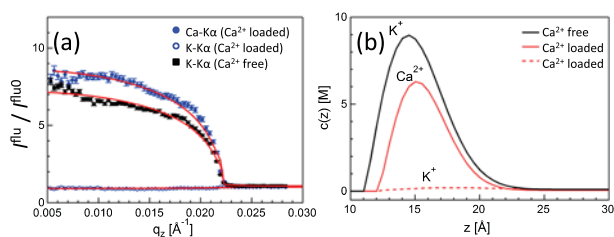


図2 気液界面でのGIXFとXRR/GIXFの組み合わせ。



**図 3**  
 (a) グラム陰性菌変異体から抽出したリポ糖脂質 (LPS Ra) 膜の X 線蛍光シグナルを  $q_z = (4\pi/\lambda) \sin \theta$  の関数でプロットしたもの。膜の存在下でのシグナルをバッファーのみのもので標準化すると  $q \leq q_z$  の強度から、界面近傍でのイオンの濃縮が検出できる。カルシウムが入ったバッファー (○・●)、抜きのバッファー (■) で測定した結果の比較。(b) 実験結果から計算したイオンの膜面に垂直な方向の空間分布。カルシウム存在下では界面近く ( $z=0$  は気相と炭水素鎖の界面に規定) のカリウムがカルシウムにほぼ完全に置換されることが解明できる。

ポ糖脂質 1 分子あたりカルシウムイオンが 1.1 個、界面から  $5 \pm 2 \text{ \AA}$  の位置で糖鎖に結合している」といった、既存の実験手法では検出不可能であった極めて高精度での生体・ソフト界面の静電相互作用の定量化をはじめて可能にした<sup>6)</sup>。これらの実験結果と、従来の電子密度の空間分布から得られる界面のメゾ構造に関する情報や、疎視化モデルを用いたモンテカルロ法を相補的に用いることで、ソフトマター物理の新たな領域が開拓できると期待される。

#### 4. 膜・タンパク質相互作用への応用

ここで紹介した GIXF と XRR/GISAXS の組み合わせは、これまで見る事ができなかったメゾスコピック空間での膜・タンパク質相互作用の描像にも大きく貢献できる。この場合標的とする元素は、アミノ酸に含まれる硫黄である。標的とするタンパク質のアミノ酸配列がわかっている場合、XRR/GISAXS と GIXF の組み合わせは、硫黄の密度分布からタンパク質の表面密度の測定を可能にするだけでなく、界面に垂直方向の位置を高精度で特定することをも可能にする。特に後者の情報はタンパク質が柔らかい界面 (例えばリポ糖脂質などの高分子鎖) にどのくらいの深さまで貫入しているかを特定可能にするので、大きなブレークスルーを生み出す可能性がある。

これまで、タンパク質が膜に吸着するか貫入するかの見分けは、実験的には単分子膜を用いた表面圧・電位測定、走査型比熱系などの熱力学測定のほか、核磁気共鳴や赤外分光といった手法が用いられてきたが、「小さな分子が膜にどれだけ吸着し、どこまで深く入るのか」という情報を数 Å の精度で測定することはできなかった。実際筆者のグループでは、正の荷電を

持った 2 つの異なるペプチド (ニシンの精子から抽出したプロタミンと、敗血症治療用に開発された薬剤候補) がリポ糖脂質と相互作用するメカニズムの違いを見分けることに成功しており<sup>7)</sup>、他の天然化合物へのさらなる展開が期待される。

#### 5. 膜面上での非結晶性粒子間の相関

生体膜は流体としての特性を保持しつつ、さまざまな長さスケールの静的あるいは動的な不均一性を有している。実際に生体膜はタンパク質が脂質のスープの中を泳いでいる、というよりは非常に混み合った環境に混在しているといったほうが現実的である。このような「混みあった流体場での非結晶性粒子間の相関」は、主に単分子蛍光法などを用いた拡散運動の視点から記述されることが多く、波数空間の実験は結晶性のタンパク質の電子・X 線回折が主であった。

しかし自然界を見渡せば、非結晶性のタンパク質 (例・GPI アンカーに接続したタンパク質) が密に細胞表面を覆い、これが重要な機能を持つことが多い。例えばアフリカで家畜のナガン病や眠り病を引き起こすトリパノソーマの表面は、変異性表面糖タンパク質という非結晶性の GPI 結合型タンパク質でほぼ 100% 覆われている。このタンパク質の層は宿主の免疫系からの攻撃を防ぐだけでなく、最近の論文ではトリパノソーマが泳ぐに伴ってこのタンパク質がソーティングされるということが報告されている<sup>8)</sup>。

このように混みあった空間に存在するタンパク質の多体相互作用がどのくらいの距離まで及ぶかといった、相関強度の測定には GISAXS が非常に適している。GISAXS は元来固体物理の分野で金属クラスターや量子ドットの成長過程の観測に用いられてきた実験手法で、近年ではブロック共重合体の相分離構造や有機太陽電池などの内部微小構造の評価にも応用されてきた。しかしながら、タンパク質についてはまだその応用はかぎられており、油水界面に凝集したウイルス粒子の検出など限られた系での報告にとどまっていた<sup>9)</sup>。

昨年筆者のグループは、脂質膜上に吸着した非結晶性のアビジン誘導体の GISAXS 測定にはじめて成功した<sup>10)</sup>。図 4 に示すように、 $q_z$  方向に積分した GISAXS シグナルは形状因子  $F$  と構造因子  $S$  を用いて

$$I(q) = A |F(q, D, H)|^2 \times S(q, D, \eta)$$

のように  $q_y$  の関数で表せる ( $q_y, q_z$  の定義は図 1 を参照、 $\eta$  は体積率)。ここではタンパク質をシリンダー状の粒子と仮定し、構造因子を 2 次元多体相関モデル

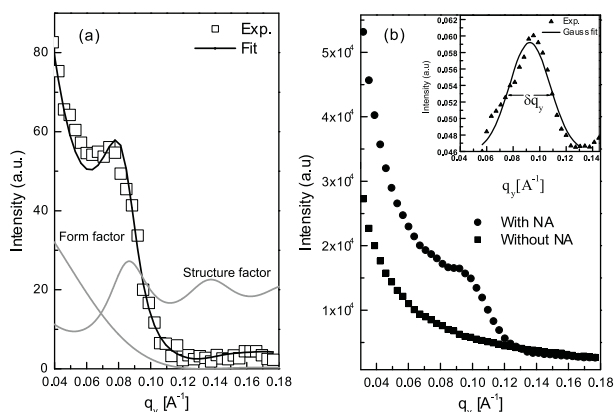


図 4 気液界面の脂質膜上に固定されたタンパクの GISAXS パターン。(a) 形状因子  $F$  と構造因子  $S$  の要素に分けて、実験結果をよく再現するモデル (実線) が得られた。(b) タンパクの存在下と不在の場合の信号強度の差 (インセット) の幅から非結晶性タンパクの相関持続長  $\xi = (2\pi/\delta q_y)$  を計算できる。

(Percus-Yevick 関数) で表した。形状因子と構造因子を分離することで (1) タンパク質の直径  $D \sim 5.7$  nm, (2) タンパク質の高さ  $H \sim 5.2$  nm, そして (3) タンパク質間の平均距離  $\langle d \rangle \sim 7.4$  nm が得られる。またタンパク質存在下と標準サンプルとの差 (インセット) からタンパク質同士の相関距離  $\xi \sim 20$  nm が計算できる。この結果から、タンパク質分子同士の相関が平均距離の 3 倍の距離まで及んでいることがはじめて定量できた。

このような構造や相関の超精密測定を、1 分子蛍光や理論計算と組み合わせることで、糖鎖修飾など分子レベルの変化や外場が膜面上でのタンパク質の動態に与える影響が明らかになることが期待される。

## 6. おわりに

準 2 次元構造をとる生体膜のメゾスコピックな階層構造や、膜と外部因子の相互作用を定量するためには、本稿で紹介したような散乱・鏡面反射などを含む波数空間の実験手法は非常に有効である。特に近年

は、これまで用いられてきた膜やタンパク質を均一に分散した粉体散乱だけでなく、膜の構造異方性に関する情報を失うことなく定量できる、平面膜モデルを用いることが可能な装置が数多く開発されてきた。

本稿で紹介したように、これらの装置の進歩は、決して新しい技術を装置の開発を行う研究者だけのものとして囲い込むものでなく、新しいユーザー層をひきつけ、今までにない研究を行う可能性を広げてくれる。世界的な観点から見ても、日本は SPring-8 や J-PARC といった、量子ビームを用いた研究において、世界で最先端の設備に恵まれた環境にあり、将来的にさらに大きな成長が見込まれる。既存の技術では実現不可能な精度の測定を可能にする、これらの新技術は、凝縮系や固体物理からソフトマター、そして生物物理の研究者が出会う新たな出会いの場を提供してくれることが期待される。

## 文 献

- 1) Hardt, S. L. (1979) Biophys. Chem. **10**, 239-243.
- 2) Tanaka, M., Sackmann, E. (2005) Nature **437**, 656-663.
- 3) Miller, C. E. *et al.* (2005) Phys. Rev. Lett. **94**, 238104.
- 4) Mora, S. *et al.* (2004) Europhys. Lett. **66**, 694-700.
- 5) Oliveira, R. G. *et al.* (2009) Phys. Rev. E **81**, 041901.
- 6) Schneck, E. *et al.* (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **107**, 9147-9151.
- 7) Abuillan, W. *et al.* (2013) Phys. Rev. E **88**, 012705.
- 8) Engstler, M. *et al.* (2007) Cell **131**, 505-515.
- 9) He, J. *et al.* (2009) Langmuir **25**, 4979-4987.
- 10) Abuillan, W. *et al.* (2012) J. Chem. Phys. **137**, 204907.



田中 求 (たなか もとむ)

ハイデルベルク大学教授 (化学・物理学), 京都大学物質-細胞統合システム拠点教授  
1998 年京都大学博士 (工学), 2005 年ミュンヘン工科大学上級学位 (物理学)  
研究内容: 生命物理, 非平衡ソフトマター, 放射光・中性子散乱  
連絡先: 〒 606-8501 京都大学物質-細胞統合システム拠点 (WPI iCeMS)  
E-mail: mtanaka-g@icems.kyoto-u.ac.jp  
URL: www.pci.uni-heidelberg.de/bpc2

理論 / 実験 技術

用語解説

### 複雑液体

Complex fluid

ニュートン流体のように粘性によって記述される塑性変形 (Plastic deformation) だけでなく弾性変形 (Elastic deformation) の項を持つ液体。高分子

溶液や生体膜, 細胞の力学的記述に用いられる。  
(114 ページ)

(田中)

※本文中ゴシックで表記した用語を解説しています。