

総合論文

試料水平型 X 線反射率計の高度化と液体表面の構造解析

矢野 陽子^{®1}, 宇留賀朋哉², 谷田 肇², 豊川 秀訓², 寺田 靖子², 山田 廣成³

X 線反射率は、界面深さ方向の電子密度分布をサブナノメートルオーダーの分解能で得る構造解析手法である。これまで我が国の放射光施設には、試料水平型の反射率計がなかったが、最近 SPring-8 の分光分析ビームライン BL37XU に溶液界面の構造研究を目的とした装置が立ち上がった。本装置は従来の装置では実現の難しかった迅速測定や、鏡面反射とその周囲の微弱な散漫散乱強度から界面に垂直及び水平方向の構造を同時に観測するといった特徴を備えている。本装置を用いたイオン液体水溶液表面の構造解析及び時分割測定によるタンパク質の気液界面吸着過程について紹介する。

1 はじめに

液体表面は最近接分子（あるいは原子）の結合力が欠けていることから、液体内部とは異なる構造を持つことが予測される。液体表面の物性を表す最も基本的な物理量である表面張力とは、表面と内部の自由エネルギーの差を表しており、この値が最小になるように表面構造を形成する。例えば、水素結合ネットワークの発達した水は非常に高い表面張力の値を示すが、界面活性物質を混合すると表面張力は一気に低下する。これは水表面を分子間相互作用の小さな界面活性物質が覆うためである。界面活性物質はたいいてい親水基と疎水基からなる両親媒性物質であり、疎水基を気相側、親水基を水相側に向けて配列する。両親媒性物質は、いわゆる界面活性剤と呼ばれる長鎖分子のみならず、アルコールのような小さな分子からタンパク質にまで及ぶ。このような界面吸着膜の構造を知る有力な研究手段として X 線反射率法がある。

X 線反射率法は、界面の構造を非破壊的にサブナノメートルオーダーの分解能で得る構造解析手法であり、固体表面に限らず、様々な界面に応用可能な手法として有望視されている¹⁾。液体表面の構造研究においても、液体金属における表面層構造の形成²⁾、直鎖炭化水素の表面凝固現象³⁾など、本手法を使って初めて発見された物理現象も多い。しかしながら、これまで我が国の放射光施設には試料水平型の X 線反射率計がなかった。本稿では、最近 SPring-8 に立ち上がった溶液界面反射率計とそれを用いた液体表面の構造研究例について紹介したい。

2 X 線反射率法

2・1 理論

X 線の物質に対する屈折率は 1 よりわずかに小さいことから、斜入射条件では全反射を起こす。鏡面反射強度の角度依存性を測定する方法は X 線反射率法と呼ばれ、界面深さ方向の電子密度分布を非破壊的にサブナノメートルオーダーの分解能で得る構造解析手法である¹⁾。Fig. 1 に反射率法のご概念図を示す。界面に対する X 線の入射角を α とした時、散乱ベクトル q ($= 4\pi \sin \alpha / \lambda$, λ は X 線の波長) は、常に界面に垂直となる。よって反射率の q 依存性を測定すると式 (1) 及び (2) から界面深さ方向の電子密度分布 $\rho(z)$ を得ることができる。

$$\frac{R(q)}{R_F(q)} = |\Phi(q)|^2 CW(q, T, \gamma) \quad (1)$$

$$\Phi(q) = \frac{1}{\rho_{\text{bulk}}} \int \frac{d\langle \rho(z) \rangle}{dz} \exp(iqz) dz \quad (2)$$

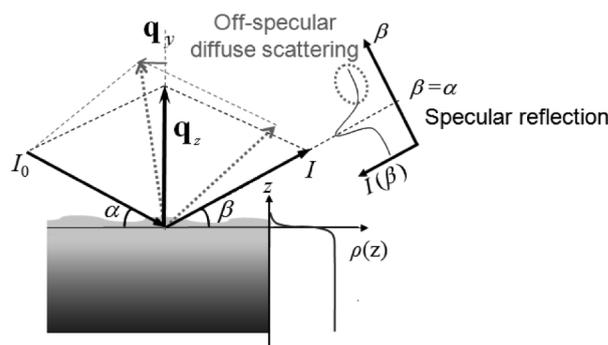


Fig. 1 Geometry of the X-ray specular reflection and off-specular diffuse scattering

¹ 立命館大学総合理工学研究機構：525-8577 滋賀県草津市野路東 1-1-1

² 財団法人高輝度光科学研究センター：679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

³ 立命館大学理工学部：525-8577 滋賀県草津市野路東 1-1-1

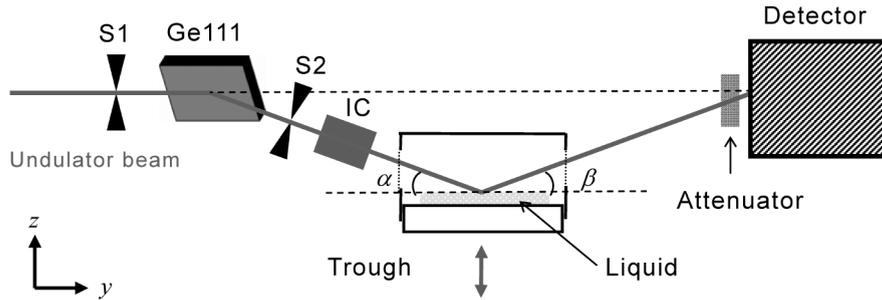


Fig. 2 Schematic view of the liquid interface reflectometer at the SPring-8 BL37XU beamline
Cr, Ge 111 deflecting crystal monochromator ; IC, ion chamber ; S1 and S2, slit systems.

ここで $R_F(q)$ は理想的に平坦な表面からのフレネル反射率、 $\langle \rho(z) \rangle$ は静的な状態における xy 面内の電子密度の平均値である。表面張力 γ 、温度 T 、散乱ベクトル q で決まる $CW(q, T, \gamma)$ は、液体の表面及び界面特有の項であり、液面に立つさざ波 (capillary wave) によって本来持つ密度分布が乱される効果を表している。

$$CW(q_z, T, \gamma) = \exp(-\sigma_{cw}^2 q_z^2) \quad (3)$$

$$\sigma_{cw}^2 = \left(\frac{k_B T}{2\pi\gamma} \right) \ln \left(\frac{q_{max}}{\Delta q_{res}} \right) \quad (4)$$

ここで σ_{cw} は、capillary wave による表面ラフネスである。実際には、用いた装置の角度分解能 Δq_{res} より小さな q 領域の散漫散乱は鏡面反射と分離することができないため、 Δq_{res} を含む見かけのラフネスとして算出する。Capillary wave の高波数限界は分子間距離 d_M を用いて $q_{max} \sim 2\pi/d_M$ のように表される。例えば 20°C の水の場合は capillary wave による表面ラフネスは 4.0 Å であるが、実際に観測される値は 3 Å 程度である。反射率の実測値から $CW(q_z, T, \gamma)$ を解析的に取り除くことによって、液体本来の持つ電子密度分布を $\langle \rho(z) \rangle$ を知ることができる¹⁾。

式(2)のように構造因子 $\Phi(q)$ は電子密度分布の1次微分に依存する。バルクと電子密度が異なる部分を界面層とみなす。電子密度分布の解析においては、たとえ1成分からなる単一層であっても、深さ方向に電子密度の偏りがある場合には、それを異なる電子密度を持ついくつかの仮想的な層に分けて考えるのが有効である。これは BOX モデルと呼ばれる。気液界面を0とし、 N 層の界面で分割した場合は、式(5)のような誤差関数で密度プロファイルを記述することになる¹⁾。

$$\rho(z) = \sum_{j=0}^N \frac{1}{2} (\rho_{j+1} - \rho_j) \times \left(1 - \operatorname{erf} \left(\frac{z - z_j}{\sqrt{2}\sigma_j} \right) \right), \quad (5)$$

$$1 - \operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_x^{\infty} \exp(-t^2) dt$$

ここで z_j と σ_j は界面 j の深さとラフネスを表し、 ρ_j は界面 j と $j+1$ の間の層の平均電子密度を表している。

他方、反射スポットの周囲に生じる散漫散乱は Fig. 1 のように散乱ベクトル q が q_y 成分を持つことから界面水平方向の構造情報を含む。ところが散漫散乱強度は鏡面散乱の数桁小さいため、X線反射率測定とは独立に測定を行わなくてはならないこと、バックグラウンド散乱の除去が難しい等の理由から、これまで反射率法ほど用いられていなかった。

2.2 試料水平型反射率測定装置

X線反射率測定を用いてサブナノメートルの分解能で構造を解析しようとする場合には、 q^{-4} で減衰する反射率の変化を何桁にも渡って高精度で測定しなければならないことから高輝度光源を必要とする。また、液体試料を扱うためには、試料水平型の反射率計を用いる必要がある。すなわち、入射 X 線を液面に対して任意の角度で振り下げなければならないので、試料自身を傾けることのできる固体表面よりも複雑な光学系となる。それゆえ 1980 年代にドイツの HASYLAB に第 1 号機⁴⁾ が建設されて 30 年ほど経った現在でも、海外の放射光施設で稼動する試料水平型の反射率計は 10 台ほどしかない。最近 SPring-8 利用者懇談会『ソフト界面科学研究会』のメンバーが中心になって分光分析ビームライン BL37XU に試料水平型反射率計を立ち上げた⁵⁾⁶⁾。概略を Fig. 2 に示す。Ge 111 結晶 (Cr) の煽り角を変えることによって、エネルギー 15 keV ($\lambda = 0.826 \text{ \AA}$) の X 線の液面への入射角を調整している。検出器にはパルス計数型の 2 次元ピクセルアレイ検出器 (PILATUS-100K, DECTRIS Ltd.⁷⁾) を用いている。PILATUS は、ダイナミックレンジが広い、読み出し時間が短い、ピクセルごとにエネルギー^{しきい}閾値を設定できるといった特徴を備えている⁸⁾。特に本研究においては、ノイズフリーであること、隣接したピクセルへの強度の染み出しがないことが、鏡面反射の周囲に生じる微弱な散漫散乱も同時に測定し、界面垂直方向だけでなく水平方向の構造情報も同時に取得することを

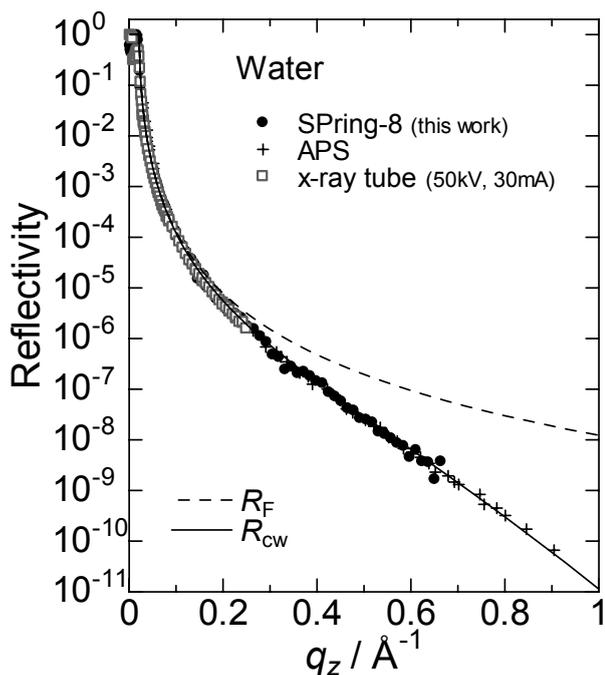


Fig. 3 X-ray reflectivity of water surface

The present data (●), and those measured at APS (+), and using an X-ray tube (□). The solid curves represent the theoretical predictions based on the capillary wave model and are calculated using Eqs. (1) ~ (4), with R_F denoted by the dashed curve.

可能にした⁹⁾¹⁰⁾. 検出光子数を 10^6 counts/pixel/s (数え落とし 10% 以内) 以下に抑えるために, 検出器前に厚さ 1~6 mm のアルミの減衰板を設置して, 入射角におうじて厚さを変えている. 入射角を変える際には, 結晶モノクロメータの角度, スリットの位置, 試料の位置, 減衰板の厚さを変えなければならないため, 通常は 1 つの反射率曲線を得るのに 30 分から数時間ほどかかるが, 本装置は, すべての駆動軸の動作を同期させ, かつ高速化することによって, 従来の装置の 10 分の 1 程度の測定時間を実現している.

Fig. 3 に著者らの装置を用いて測定した水の反射率曲線を示す⁵⁾⁶⁾. 15 keV の X 線を用い, 入射角 3° まで 1 つの角度あたり 1 秒で測定した. 実測値は capillary wave 理論と良い一致を示している. 実験室の光源を用いた測定¹¹⁾よりも 3 桁小さい反射率までを測定することができた. その一方で, 米国の放射光施設 APS における測定データ¹²⁾よりも 2 桁劣るのは, 著者らは試料-検出器間に受光スリットを設置しておらず, バックグラウンド散乱が大きいためである. しかしながら, APS における測定は, 本装置のわずか 220 秒という測定時間には太刀打ちできないと思われる.

3 イオン液体水溶液の表面

3.1 イオン液体

界面活性物質が水表面に吸着していることを直接観測し

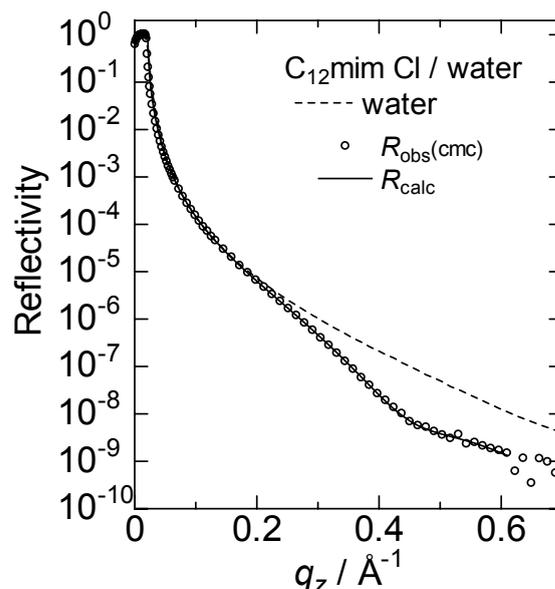


Fig. 4 X-ray reflectivity of aqueous ionic liquid surface. The continuous line is the fit to the data. The dashed line is the reflectivity of water shown for comparison.

た例を示す. 用いた界面活性物質は 1-Dodecyl-3-methylimidazolium chloride, $C_{16}H_{31}ClN_2$ である. この物質は常温で固体であるが, アルキル鎖の短いもの ($[C_n \text{mim}] \text{Cl}$, n はアルキル鎖の炭素数) は, 常温で液体のイオン液体と呼ばれている. 一方, アルキル鎖の長さが増すと界面活性剤としての性質が際立ってくる. $n > 6$ でミセル形成が観測されており, 臨界ミセル濃度 (cmc) は n と伴って低濃度側にシフトする¹³⁾.

イオン液体とは常温で液体状の有機塩である. 極性が高く低粘度である上に, 分子構造を少し変えることによって物性を変えることができるため, デザインナブル液体として多方面にわたって注目を浴びている¹⁴⁾. イオン液体が常温で液体である理由は, 複雑な分子構造とイオン又は特定の官能基 (あるいは原子) 間の相互作用にある. すなわち, イオン間に働く力が静電的なクーロン力だけでなく, 水素結合があることが無機の熔融塩と大きく異なる点である. 純粋なイオン液体 ($[C_4 \text{mim}]$ のアニオンが BF_4 と PF_6 のもの) の X 線反射率測定は 2005 年に APS で行われており, 10 桁にわたる強度測定から表面の密度がバルクに比べて 18% 大きいという結果が得られている¹⁵⁾. 一方, 斜入射配置の X 線回折測定からは, 表面内での配向を示唆するような結果は得られていない¹⁶⁾.

3.2 $[C_{12} \text{mim}] \text{Cl}$ 水溶液の X 線反射率と得られた電子密度分布

Fig. 4 に臨界ミセル濃度 (0.02 mol/dm^3) の $[C_{12} \text{mim}] \text{Cl}$ 水溶液の X 線反射率曲線を示す. 水 (破線) が単調な減衰

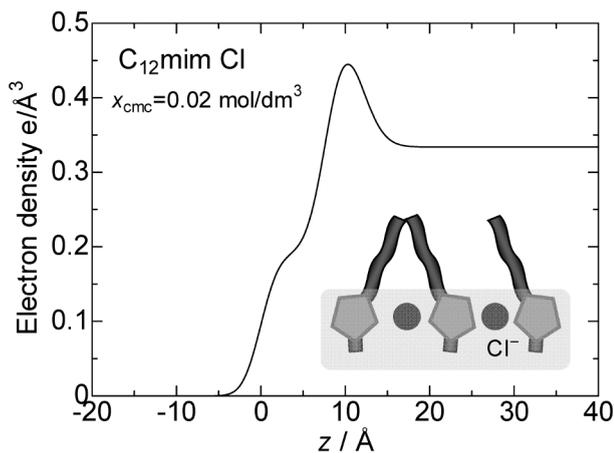


Fig. 5 Electron density profile for an aqueous [C₁₂mim]Cl solution corresponding the fits to the reflectivity data shown in Fig. 4

The inset shows the structure of the surface monolayer predicted by the electron density profile.

関数であるのに対し、 $q_z \sim 0.4 \text{ \AA}^{-1}$ 付近に極小値が観測されている。これは Kiessig fringe と呼ばれており、水面上の薄膜の存在を示唆している。2-box モデル (2・1 参照) を使ってフィットすると、Fig. 5 のような深さ方向の電子密度分布が得られる。 $z \sim 0 \text{ \AA}$ 付近のショルダーはアルキル鎖、 10 \AA 付近のピークは電子密度の大きい Cl^- イオンの位置を表している¹⁷⁾。電子密度の値から、Fig. 5 の挿入図のように、 Cl^- イオンはイミダゾリウム環の隣に配置していることが分かった。このようにサブナノメータの分解能で電子密度分布を得る場合は、少なくとも 9 桁以上に渡る反射率測定が必要であり、放射光源を使った測定が有効であることが分かる。

4 タンパク質の気液界面吸着過程

生体内のタンパク質は、分子内外の様々な相互作用 (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) の絶妙なバランスによって最も安定な構造をとるため、外部環境の変化によって容易に変性してしまう¹⁸⁾。それゆえ、タンパク質が熱力学的な最安定構造 (ネイティブ状態) から、外部環境の変化に応じて変性 (アンフォールド状態) する際の構造変化を追跡することによって、タンパク質の立体構造形成機構のヒントを得ることができると思われる。タンパク質の変性を誘発する代表的な外的要因には、熱、pH、圧力、変性剤などがあるが、これらはすべて水溶液内で起こるため、X 線散乱等によって得られる構造情報は空間的に平均化されてしまう。

一方、タンパク質は、疎水性と親水性のアミノ酸残基を併せ持つ両親媒性分子であり、いわゆる界面活性剤と同様

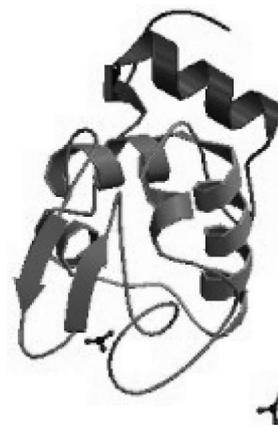


Fig. 6 Structure of hen egg lysozyme (PDB ID 1 lma)

に気水界面に選択的に吸着する性質がある。この際、水溶液中とは異なり、気相側に疎水基、水相側には親水基が寄り集まった構造に変性することが予測される¹⁹⁾。気液界面の変性に伴うタンパク質の構造変化は従来表面張力の変化から予測されてきた²⁰⁾が、直接捉えた研究例は非常に少ない。そこで著者らは時分割 X 線反射率法により気液界面に吸着する過程におけるタンパク質の構造変化を追跡することを試みた。

4・1 卵白リゾチーム

本研究で用いたタンパク質はリゾチームという多糖類を分解する酵素である。ヒトの場合涙や鼻汁、母乳などに含まれている。工業的には卵白から抽出したリゾチームが食品や医薬品に应用されている。Fig. 6 のように α ヘリックス及び β シートからなり、4 つの S-S 結合を持つ卵型の分子 (大きさは $30 \times 30 \times 45 \text{ \AA}^3$) である。

リゾチームの気液界面吸着は他のタンパク質に比べて非常に遅く、吸着平衡に達するまでに数時間を要する²⁰⁾。また低濃度ほど遅いことが知られている。これはリゾチームが S-S 結合を持つ比較的硬い (構造安定性の高い) 分子であり、変性状態に移移するのに時間がかかるためだと予測されているが、これまでその構造変化を直接捉えた研究はほとんど無い。2006 年に Lad らが鏡面反射赤外分光法によってリゾチームの気液界面吸着過程の 2 次構造の変化を追跡したところ、界面吸着直後のリゾチームは、水溶液内部よりも β シートに富んでいるが、吸着過程が進行するに従ってらせん構造由来のアミド I 振動バンドの信号が増加することを報告している²¹⁾。

一方、水溶液中のリゾチームの折り畳み過程には少なくとも 2 つの経路が存在すると言われている。 α ヘリックス・ドメインが先に完成する過程と、 α ヘリックス及び β シート・ドメインが同時に完成する過程である²²⁾。果たして疎水性界面への吸着過程においては、溶液中とどのよう

な違いが得られるのか, 大変興味深い。

4.2 時分割 X 線反射率測定²³⁾

リゾチームを pH 7 のリン酸緩衝溶液に注入してから, 約 2 時間に渡る時分割 X 線反射率測定を行った。Fig. 7 は自動タンパク注入システムを備えたトラフである。ヒートシンクの上に乗せ, 温度を $25 \pm 1^\circ\text{C}$ に保った。また蒸発を防止するために, アクリル製のカバーがしてあり, X 線透過窓の部分にはカプトンフィルムが貼ってある。測定は溶液注入 4 秒後に開始し, 150 秒のスキャンを数時間に渡って繰り返した。Radiation damage を避けるために, トラフを常に並進させ, 同じ場所に 1 秒以上 X 線を照射し続けないうようにした。Fig. 8 に注入直後のリゾチームの X 線反射率曲線をフレネル反射率 R_F で割ったもの (左) と, 得られた界面深さ方向の密度プロファイルを示す。注入後のリ

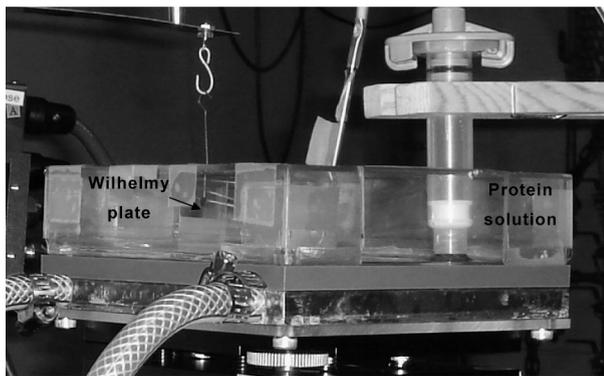


Fig. 7 Protein injection system

The protein solution was injected into the buffer solution at pH 7 using a liquid dispenser. The surface pressure was monitored throughout using a Wilhelmy plate mounted on the trough.

ゾチームの濃度を図中に記した。吸着直後のリゾチームは高密度の上部と低密度の下部からなる層を形成し, その厚さは 20 \AA 以下であることが分かる。これはネイティブの状態の厚さ (最小長さ 30 \AA) よりも薄い。また濃度が低くなると, リゾチームの密度と厚さが伴に小さくなっているのが分かる。

Fig. 9 は密度プロファイルの時間変化を示したものである。溶液濃度によって変化の仕方が大きく異なっているのが分かる。1 mg/mL の場合は, 1 層目の密度プロファイルは変化せず, 1 層目の下に形成された新たな層の密度及び

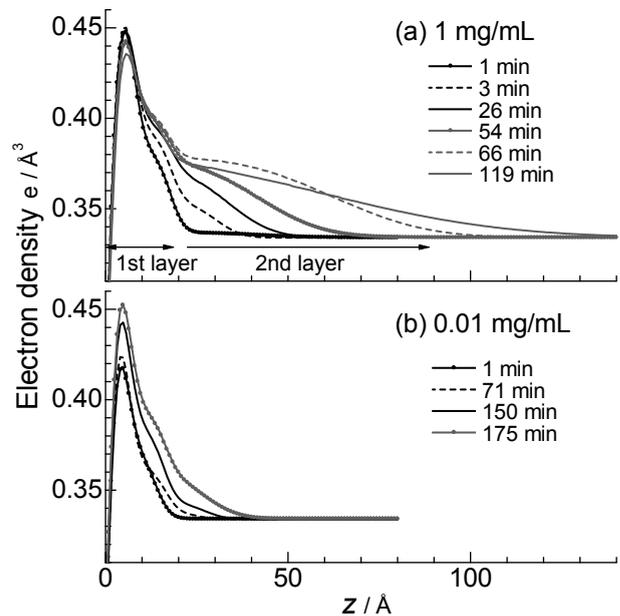


Fig. 9 Time dependence of electron density profiles with bulk concentration of (a) 1 mg/mL and (b) 0.01 mg/mL

The curves are the fits to the reflectivity data.

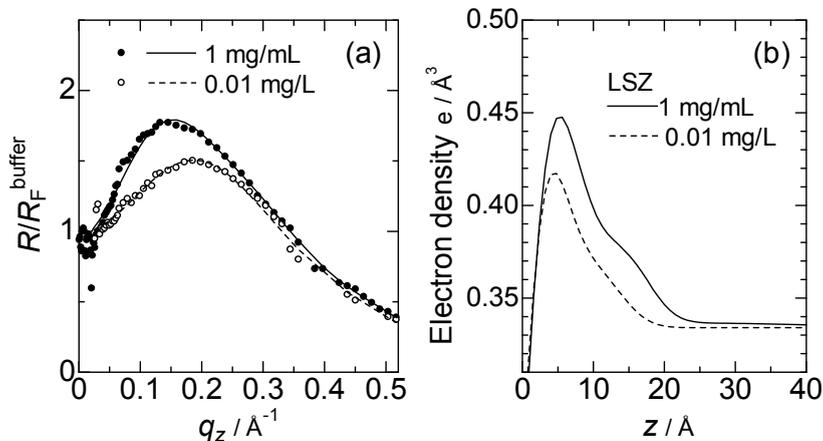


Fig. 8 (a) X-ray reflectivity profiles measured 1 min after LSZ injection. The data were divided by the Fresnel reflectivity of the air/buffer interface. The continuous lines are the fit to the data. (b) Electron density profiles corresponding the fits to the data.

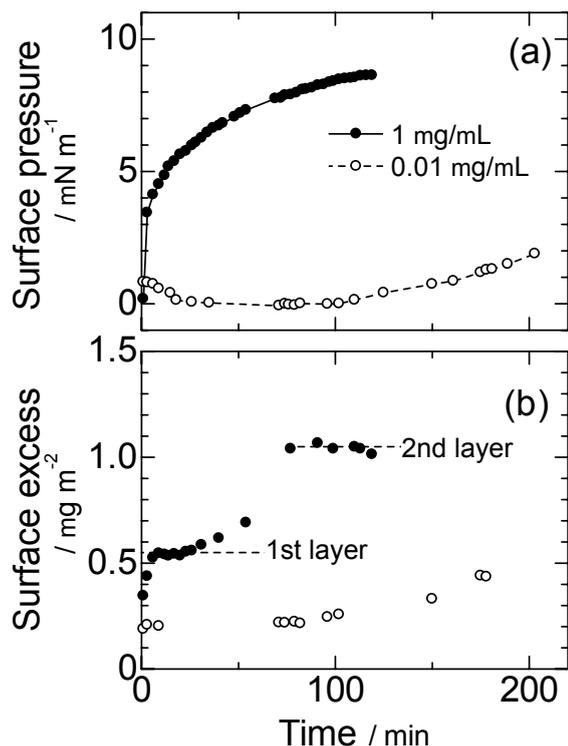


Fig. 10 (a) Variation of surface pressure; (b) Variation of surface excess calculated by integration of the electron density profiles shown in Fig. 9

厚さが徐々に増加していった。一方 0.01 mg/mL の場合は、1 層目の密度が時間とともにほぼ相似形を保ったまま増加した。175 分後のデータは、1 mg/mL の場合の 6 分後 (Fig. 9 には表示していない) のプロファイルと完全に一致したことから、低濃度では吸着過程が非常に遅くなっていると言える。

同時に測定していた表面圧の変化を Fig. 10 (a) に示す。1 mg/mL の場合は一般の界面活性剤と同様に注入と同時に表面圧の急激な上昇が見られた。一方、0.01 mg/mL の場合は始め 2 時間ほど表面圧がほとんど変化しなかった。これは induction time と呼ばれ、リゾチームなどの堅いタンパク質が低濃度の場合に見られる現象である²⁰⁾。蛍光顕微鏡によって、リゾチームが単分子で吸着している状態 (分子同士の相互作用が無いという意味でガス状吸着と呼ぶ) であることが観測されている²⁴⁾。よって、Fig. 9 と合わせて考えると、induction time ではリゾチームは単分子膜濃度以下で吸着しているということが予想される。膜の濃度を評価するために、Fig. 9 のプロファイルから水の電子密度 ($0.334 \text{ e}/\text{\AA}^3$) を差し引き、積分したものをリゾチームの表面過剰量として Fig. 10 (b) に示した。興味深いことに 1 mg/mL には、2 つのステップが観測された。2 番目のステップは 1 番目の値のちょうど 2 倍になっていることから、始めのステップは単分子膜、2 番目は二分子膜が形

成されたと考えられる。また、0.01 mg/mL の 175 分後の値は単分子膜形成濃度に近いことが分かる。

Fig. 8~10 よりリゾチームの気液界面吸着過程について次のようなことが言える。

1. ガス状吸着: 吸着初期段階にはリゾチームは単分子で吸着する。この時、界面に広がるようにアンフォールドする。鏡面反射赤外吸収スペクトルでは β シート構造を示すバンドが顕著だったことから²¹⁾、 α ヘリックスはほどけて気液界面に広がることで薄く扁平していると考えられる。

2. 単分子膜形成: $0.45 \text{ e}/\text{\AA}^3$ に達すると、それ以上電子密度が上がらないことから、単分子膜が形成されたと考えられる。Fig. 10 (b) より、この単分子膜の密度は、ネイティブのリゾチームが密にパッキングした際の 1/4 程度である。単分子膜形成後は、リゾチーム同士の相互作用により深さ方向に厚みが増す。恐らく親水性アミノ酸残基が水中に伸びていくと思われる。

3. 二分子膜形成: リゾチーム単分子膜との相互作用により二分子膜形成を形成する。多層膜が形成される前に、いったん二分子膜ができる。2 層目の厚さは 1 層目比べて密度が小さく厚い。また、Fig. 10 (b) に見られるように電子密度の積分値は時間変化しないにもかかわらず、Fig. 9 (a) のように厚さが刻々と増加することから、かなりフレキシブルな構造だと予想される。鏡面反射赤外吸収スペクトルでは吸着過程が進行するに従ってらせん構造由来のアミド I 振動バンド (α ヘリックス又はランダムコイル) の信号が再び増加したことから²¹⁾、ランダムコイルに富んだ構造であると思われる。

4. 多層膜形成: 二分子膜の下部が伸び、多層膜を形成する。

各々の具体的な描像を Fig. 11 に示す。 β シートに富み、薄い扁平構造に変性したリゾチームがまず単分子膜を形成し、その下にランダムコイル構造に変性したリゾチームが吸着していく様子が描かれている。4 の多層膜形成については、本研究では観測されていないが、1 mg/mL の場合の平衡表面圧が 18 mN/m であることから、本研究の範囲では平衡状態に達していないと思われる。

4.3 X線散漫散乱で見える面内の構造

一方、リゾチームの等電点は pH 11.5 であり、pH 7 では正に帯電しているのであるが、塩を添加することによって、リゾチームの界面吸着量は増加することが知られている²⁵⁾。よって塩添加効果を観測することにより、リゾチームに潜む静電相互作用を選択的に抽出できるとと思われる。Fig. 12 は、2M NaCl 存在下の反射周囲の散漫散乱の 2 次元画像である。Fig. 12 (a) がリゾチーム注入前、(b) が注入後 2 時間が経過したものである。(x, z) ~ (75, 216) に観測

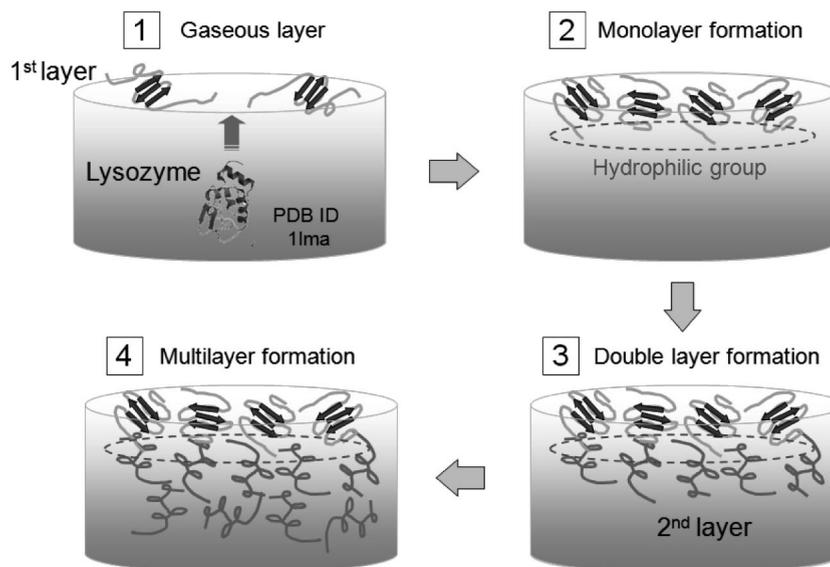


Fig. 11 Schematic diagram of the LSZ adsorption process

(1) LSZ molecules initially adsorb as a monomolecular structure with a flat unfolded conformation, forming antiparallel β -sheets as a result of hydrophobic interactions with the gas phase ; (2) LSZ molecules form a monolayer and begin to protrude their hydrophilic groups towards the water phase ; (3) A second layer forms in which the molecules have a very loose structure having random coils as a result of hydrophilic interactions with the hydrophilic groups that protrude from the first layer ; (4) LSZ molecules form a multilayer in which the molecules might have a very loose structure having random coils.

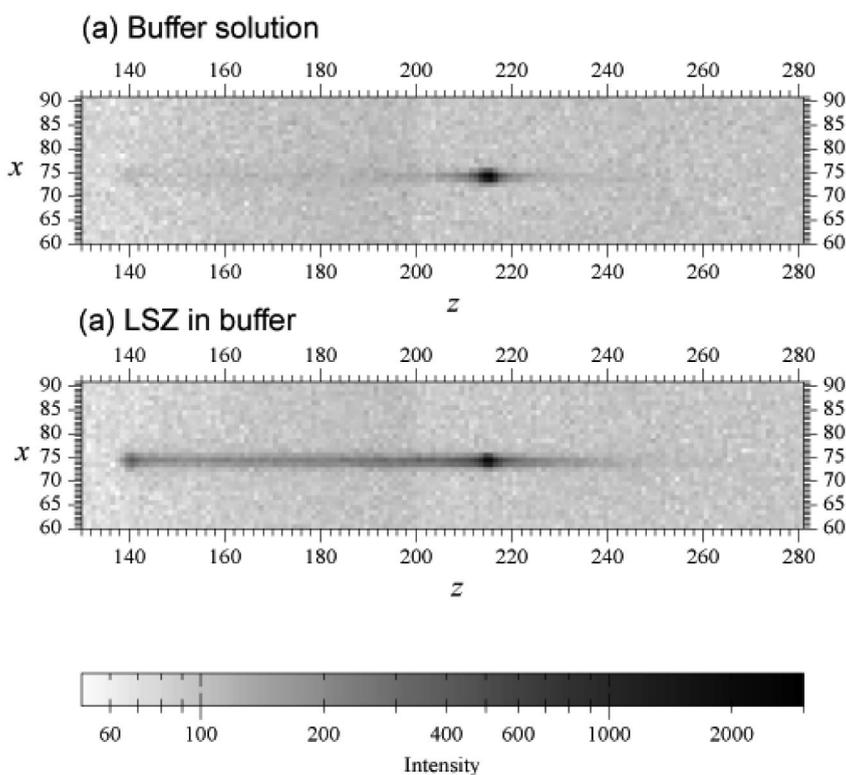


Fig. 12 Enlarge picture of an X-ray specular reflection image at $\alpha = 1.5^\circ$ of (a) buffer solution and (b) LSZ in the buffer solution

The units of the axes x and z are pixels. Each square corresponds to a pixel with dimensions of $172 \times 172 \mu\text{m}$.

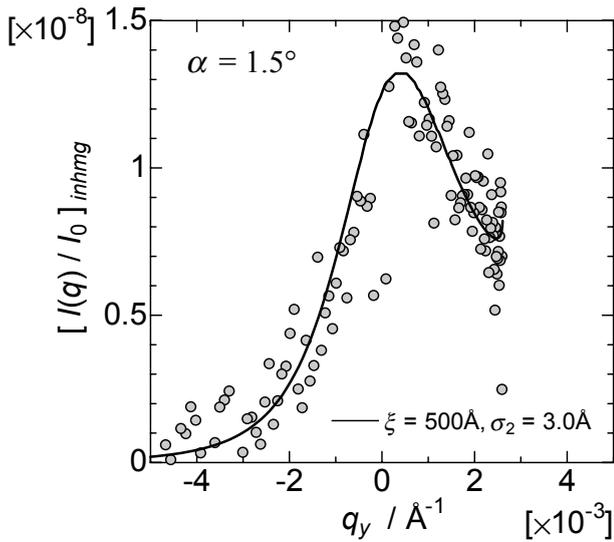


Fig. 13 Excess scattering from the inhomogeneous LSZ film adsorbed on the buffer solution with 2M NaCl. The solid curves are the best fits obtained using the inhomogeneous model with $\xi = 500 \text{ \AA}$ and $\sigma_2 = 3.0 \text{ \AA}$.

される点が $\beta = \alpha$ となる鏡面反射であり、その周囲に一直線上に散漫散乱が観測されている。Fig. 13 は散漫散乱のうち、capillary wave による寄与を差し引いたものである。リン酸緩衝溶液のみではこのような過剰な散漫散乱強度は生じない。このような過剰な散乱を生じるのは、リゾチームが界面に一樣に吸着しているのではなく、粗さ 3 \AA 、面内の相関長 500 \AA を持つ不均一な膜を形成していることを意味している⁹⁾²⁶⁾。すなわち、正に帯電していたリゾチームに電解質を加えることによってリゾチーム同士の相互作用が増加し、 Cl^- イオンを介した島状の凝集体を形成したと考えられる。

5 ま と め

本稿では、最近 SPring-8 利用者懇談会『ソフト界面科学研究会』のメンバーが中心になって立ち上げた国内の放射光施設においては実用第 1 号機となる試料水平型の X 線反射率計について紹介した。この反射率計は、傾けることのできない気液界面、液液界面の構造研究を対象としている。海外の類似の装置と比較すると、本装置は迅速測定が可能、鏡面散乱/散漫散乱同時測定により界面垂直方向/水平方向の構造情報を取得できるといった点が優れており、従来、静的な測定に限られていた本手法に新たな展開をもたらそうとしている。

本装置を用いた水面上の吸着膜に関する 2 つの研究例を取り上げた。1 つ目はイオン液体 [$\text{C}_{12} \text{ mim}$] Cl 水溶液表面の構造研究である。電子密度の比較的大きな Cl^- イオンの位置を \AA オーダーで決定することができた。2 つ目は球状

タンパク質リゾチームの水溶液表面吸着過程の時分割測定である。分オーダーの時間分解能でリゾチームが水溶液表面に吸着する過程を追跡したところ、多層膜を形成する間に絶えずコンフィギュレーション変化を起こしていることを観測した。また、散漫散乱強度から吸着膜の面内の構造も知ることができた。

本装置は本稿で取り上げた研究例以外にも、液液界面や、水面上自己組織化膜の構造研究などについて精力的に行われており、今後、益々の成果が期待される。

謝 辞

本研究は(財)高輝度光科学研究センター SPring-8 のビームライン BL37XU を用いて行われた(課題番号 2006A1124, 2006B1751, 2007A1197, 2007A1737, 2007B1091, 2007B1212, 2007B1353, 2008A1197, 2009A1431)。また、イオン液体水溶液表面の研究については、文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「イオン液体の科学」(課題番号 20031025)の補助を受けた。

なお、本稿で紹介した SPring-8 溶液界面反射率計の開発及び立ち上げは、宇都宮大学飯村兼一准教授、福岡女子大学池田宜弘教授、九州大学瀧上隆智准教授(五十音順)の尽力により実現したものである。

文 献

- 1) 桜井健次編: “X 線反射率法入門”, (2009), (講談社サイエンティフィク)。
- 2) M. J. Regan, E. H. Kawamoto, S. Lee, P. S. Pershan, N. Maskil, M. Deutsch, O. M. Magnussen, B. M. Ocko, L. E. Berman : *Phys. Rev. Lett.*, **75**, 2498 (1995).
- 3) B. M. Ocko, X. Z. Wu, E. B. Sirota, S. K. Sinha, O. Gang, M. Deutsch : *Phys. Rev. E*, **55**, 3164 (1997).
- 4) J. Als-Nielsen, F. Christensen, P. S. Pershan : *Phys. Rev. Lett.*, **48**, 1107 (1982).
- 5) Y. F. Yano, T. Uruga, H. Tanida, H. Toyokawa, Y. Terada, M. Takagaki : *J. Phys. : Conf. Ser.*, **83**, 012024 (2007).
- 6) Y. F. Yano, T. Uruga, H. Tanida, H. Toyokawa, Y. Terada, M. Takagaki, H. Yamada : *Eur. Phys. Special Topics*, **167**, 101 (2009).
- 7) <<http://www.dectris.com/>>.
- 8) 豊川秀訓, 兵藤一行 : 放射光, **22**, 256 (2009).
- 9) Y. F. Yano, T. Uruga, H. Tanida, H. Toyokawa, Y. Terada, M. Takagaki, H. Yamada : *Trans-MRS-J*, **34**, 631 (2009).
- 10) Y. F. Yano, T. Uruga, H. Tanida, H. Toyokawa, Y. Terada, H. Yamada : *J. Synchrotron. Rad.*, in press.
- 11) Y. F. Yano, T. Iijima : *J. Chem. Phys.*, **112**, 9607 (2000).
- 12) O. Shpyrko, P. Huber, A. Grigoriev, P. Pershan, B. Ocko, H. Tostmann, M. Deutsch : *Phys. Rev. B*, **67**, 115405 (2003).
- 13) M. Blesic, M. H. Marques, N. V. Plechkova, K. R. Seddon, L. P. N. Rebelo, A. Lopes : *Green Chem.*, **9**, 481 (2007).
- 14) 例えば, “特集: いま注目のイオン液体”, 現代化学, 2007 年 3 月号。
- 15) E. Solutskin, B. M. Ocko, L. Taman, I. Kuzmenko, T. Gog, M. Deutsch : *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 7796, (2005).

- 16) Y. F. Yano, H. Yamada : *Anal. Sci.*, **24**, 1269 (2008).
- 17) 矢野陽子, 宇留賀朋哉, 谷田 肇, 豊川秀訓, 寺田靖子, 山田廣成 : X 線分析の進歩, **41**, 117 (2010).
- 18) C. Branden, J. Tooze : “タンパク質の構造入門 第2版”, (2000), (Newton Press).
- 19) D. F. Cheesman, J. T. Davies : *Adv. Protein Chem.*, **9**, 439 (1954).
- 20) B. C. Tripp, J. J. Magna, J. D. Andrade : *J. Colloid Interface Sci.*, **173**, 16 (1995).
- 21) M. D. Lad, F. Birembaut, J. M. Matthew, R. A. Frazier, R. J. Green : *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **8**, 2179 (2006).
- 22) G. Wildegger, T. Kiefhaber : *J. Mol. Biol.*, **270**, 294 (1997).
- 23) Y. F. Yano, T. Uruga, H. Tanida, H. Toyokawa, Y. Terada, M. Takagaki, H. Yamada : *Langmuir*, **25**, 32 (2009).
- 24) J. S. Erickson, S. Sundaram, K. J. Stebe : *Langmuir*, **16**, 5072 (2000).
- 25) E. E. G. Rojas, S. R. Coimbra, L. A. Minim, S. H. Saravia, C. A. S. de Silva : *J. Chromatogr. B*, **840**, 85 (2006).
- 26) M. Fukuto, R. K. Heilmann, P. S. Pershan, J. A. Griffiths, S. M. Yu, D. A. Tirrell : *Phys. Rev. Lett.*, **81**, 3455 (1998).

Characterization of Liquid Surfaces Using the Advanced Surface-Horizontal X-ray Reflectometer at SPring-8

Yohko F. YANO¹, Tomoya URUGA², Hajime TANIDA², Hidenori TOYOKAWA²,
Yasuko TERADA² and Hironari YAMADA³

¹ Research organization of Science & Engineering, Ritsumeikan University, 1-1-1, Noji-Higashi, Kusatsu-shi, Shiga 525-8577

² Japan Synchrotron Radiation Research Institute, 1-1-1, Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5198

³ Department of Photonics, Ritsumeikan University, 1-1-1, Noji-Higashi, Kusatsu-shi, Shiga 525-8577

(Received 16 December 2009, Accepted 26 April 2010)

X-ray reflectivity measurements of liquid surfaces were demonstrated using a recently developed liquid interface reflectometer at SPring-8. The reflectometer has two features superior to other surface-horizontal spectrometers currently available at synchrotron facilities around the world : achieving quick measurements and investigating the surface structure for both vertical and horizontal directions simultaneously. We demonstrated X-ray reflectivity measurements of an aqueous ionic liquid, and time-resolved measurements for the adsorption process of a globular protein lysozyme on a water/air interface. X-ray specular and off-specular reflection was also investigated to analyze the out-of-plane and in-plane structures of lysozyme adsorbed at an air/water interface in the presence of a salt.

Keywords : X-ray reflectivity ; off-specular diffuse scattering ; air/water interface ; adsorption-induced protein unfolding.