

バクテリオロドプシンの分子配向制御と光電応答

Photoelectrochemical Response from Oriented Monolayers of Bacteriorhodopsin

入 江 拓*・佐 賀 佳 央*・渡 辺 正*

Taku IRIE, Yoshitaka SAGA and Tadashi WATANABE

1. は じ め に

バクテリオロドプシン (bR) は、高度好塩菌 *Halobacterium salinarium* の細胞膜に存在する膜タンパク質で、光吸収により細胞の内側から外側へプロトンを輸送する機能を持つ。bR は細胞膜中で二次元の規則正しい構造をとっており、その膜断片は紫膜と呼ばれる。bR のプロトン輸送によって生まれた電気化学ポテンシャル差を利用して好塩菌は ATP 合成を行う。

bR のプロトン輸送過程はサイクル反応である¹⁾ (Fig. 1)。発色団であるレチナールの光異性化によって反応が始まり、吸収極大の異なる準安定な中間体を取りながら進む。M 中間体の生成前後でプロトンの放出と取り込みがおこり、レチナールの再異性化の後に最初の bR に戻る。このように、プロトン輸送過程がサイクル反応であることは、光刺激の繰り返しに耐え得るため工学応用には望ましい。また、タンパク質としてはたぐいまれな安定性や容易に純品を大量に精製できることも工学的材料にふさわしく、バイオエレクトリックデバイスへの応用が期待されている。

宮坂らは、電極-溶液界面の bR に定常光を照射すると光照射の瞬間と光照射終了の瞬間にのみ一過性の光電流が発生することを見出した²⁾⁻⁴⁾。彼らはこの特徴的な光電応答を利用した視覚センサーの開発を試み、265 ピクセルの ITO (酸化インジウム・スズ) 基板に bR を固定化し、それぞれのピクセルが独立した並列回路を作製した^{5), 6)}。このセンサーに動画映像を入射するとその輪郭が出力されるが、静止映像を入射しても何も出力されない。これは、bR の微分型光電応答をうまく利用しており、bR を用いた高機能光デバイス構築の今後の展開を考えるうえで非常に興味深い。

しかし、光照射時と終了の瞬間のみ一過性の光電流が発生するというユニークな光電応答の発生機構は明らかにな

っていない。発生機構の解明は、bR を利用した高機能光デバイスの構築に欠かせないし、bR のプロトンポンプ機能のメカニズム解明に光電気化学的方法を応用するうえでも重要であると考えられる。われわれは、bR の光電流応答に対する金電極表面の酸化被膜の影響、および電解質溶液の緩衝能の影響を調べ、発生する一過性の光電流が bR のプロトン放出・取り込みに依存した電極表面の pH 変化に由来することを明らかにしつつある^{7), 8)}。

これまでの研究では bR の固定化はキャスト法で行っており、電極上の bR 分子の配向はランダムだと考えられる。bR のプロトン輸送は細胞膜の内側から外側へとというベクトル性を持つため、bR の分子配向制御は bR 固定化電極の高機能化や光電流発生機構の解明に大きく寄与すると期待できる。

そこで本研究では、紫膜の表裏の電荷分布の差を利用して bR の分子配向制御を行い、光電流応答に対する影響を調べた。

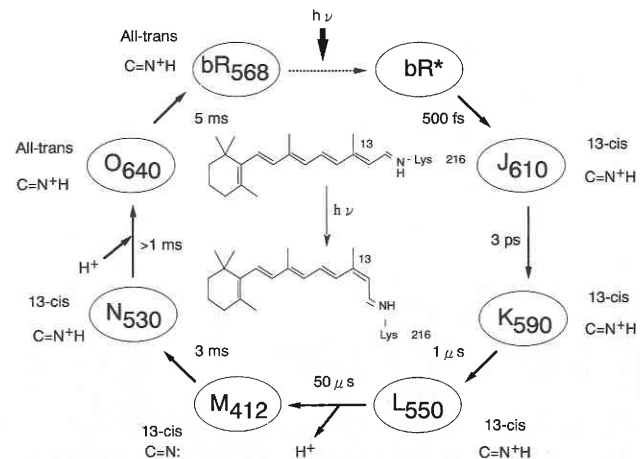


Fig. 1 Photocycle of bacteriorhodopsin.

*東京大学生産技術研究所 第4部

研究 速 報

2. 実験方法

2.1 bR 単分子膜作製 (Fig. 2)

常法⁹⁾に従って精製した bR を, 吸収極大での吸光度が約 1.5 になるように緩衝液 (10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) または 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 4.0)) に懸濁させた。

bR の単分子膜作製は過去の報告に従った¹⁰⁾. あらかじめ酸処理で表面を負に帯電させた酸化スズ電極に 5 mM ポリリジン水溶液を $0.1\mu\text{l}/\text{mm}^2$ となるよう広げ, 1 分間放置してポリリジンを電極表面に吸着させたのち, 流水で洗浄した. その後 bR 懸濁液 $20\mu\text{l}$ を $0.1\mu\text{l}/\text{mm}^2$ となるよう広げ, 1 分間放置した後超音波洗浄によって余分な bR を取り除き, 流水で洗浄した後窒素ガスで乾燥させた。

2.2 光電流応答測定

光電流の測定方法はこれまでの報告⁷⁾と同様である. 電解質溶液には 100 mM の硫酸ナトリウムを含む 5 mM HEPES 緩衝液 (pH = 7.4) を用いた. 光源として 500 W キセノンランプ (ウシオ電機, UXL-500 D-O) を用い, 水フィルターで赤外線を除いた. 紫外線カットフィルター (東芝硝子, L-39) で紫外線も除いた光をバンドパスフィルター (東芝硝子, G-55 S) に通して擬単色光を得た. なお, 作用スペクトル測定では, バンドパスフィルターの代わりに干渉フィルター (光伸光学工業) を用いた. bR 固定化電極を作用電極とし, 参照電極に銀/塩化銀電極, 対極に白金線を用い, ポテンシオスタット (東方技研, POTENTIOSTAT 2000) で電位を制御しつつ, 照射によって発生する光電流をローパスフィルター (NF 回路, E-3201 B) に通した後, オシロスコープ (Sony Tektronix, TDS 340 P) で記録した. 光強度の測定にはパワーメーター (アンリツ, MA 9411 A) を用いた。

3. 結果と考察

紫膜表面は懸濁液の pH が中性のときにはプロトン取り込み側がより負に帯電しているのに対し, 酸性ではプロト

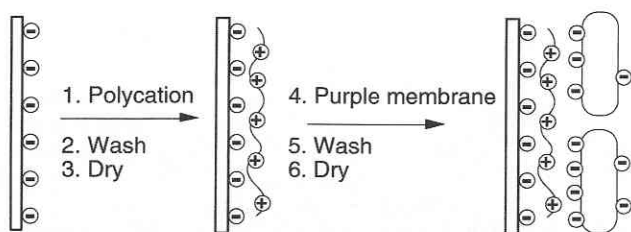


Fig. 2 Schematic drawing of the immobilization of purple membranes on an SnO_2 substrate.

ン放出側がより負に帯電する¹¹⁾. このため, bR は懸濁液が中性の場合はプロトン取り込み側が電極に向けて固定化され, 酸性ではプロトン放出側が電極に向けて固定化される。

bR 固定化電極表面を電子顕微鏡で観察した結果を Fig. 3 に示す. 黒く見える部分が紫膜である. 単分子膜とはいってもアルカンチオール自己組織化膜などのように密にパッキングしているわけではなく紫膜が島状に点在していることがわかる。

分子配向を制御した bR 単分子膜に定常光照射を行ったときの典型的な光電流応答パターンを Fig. 4 に示す. 光電流の作用スペクトルが bR の吸収スペクトルと一致することから, bR が電極に固定されており, 光電流発生の原因であることが確認できる (Fig. 5)。

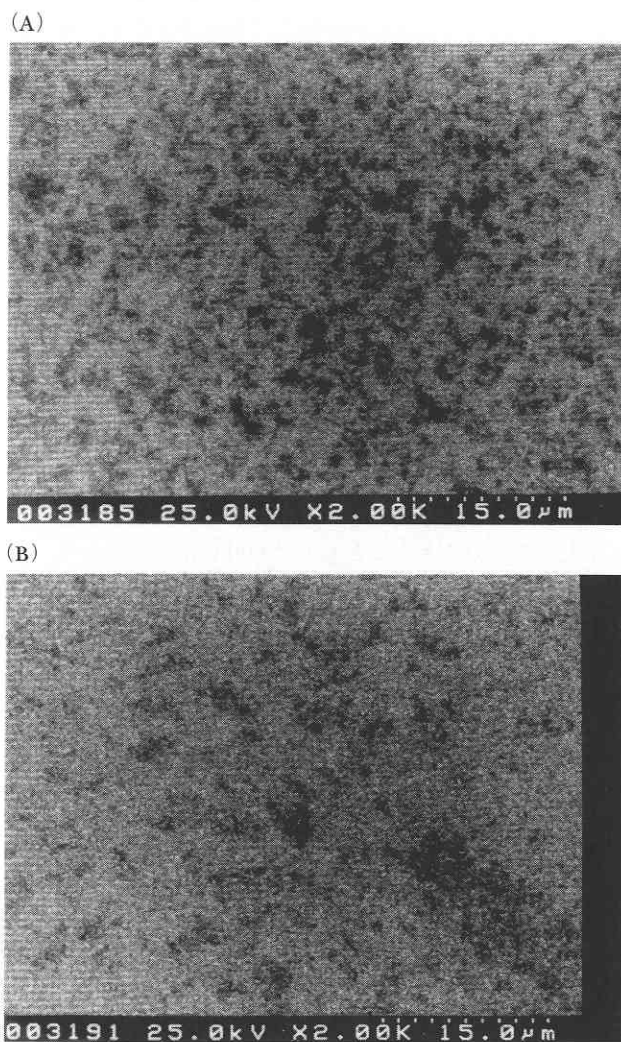


Fig. 3 SEM images of SnO_2 electrodes coated with bR monolayers. pH of bR suspension, (A) 7.0; (B) 4.0.

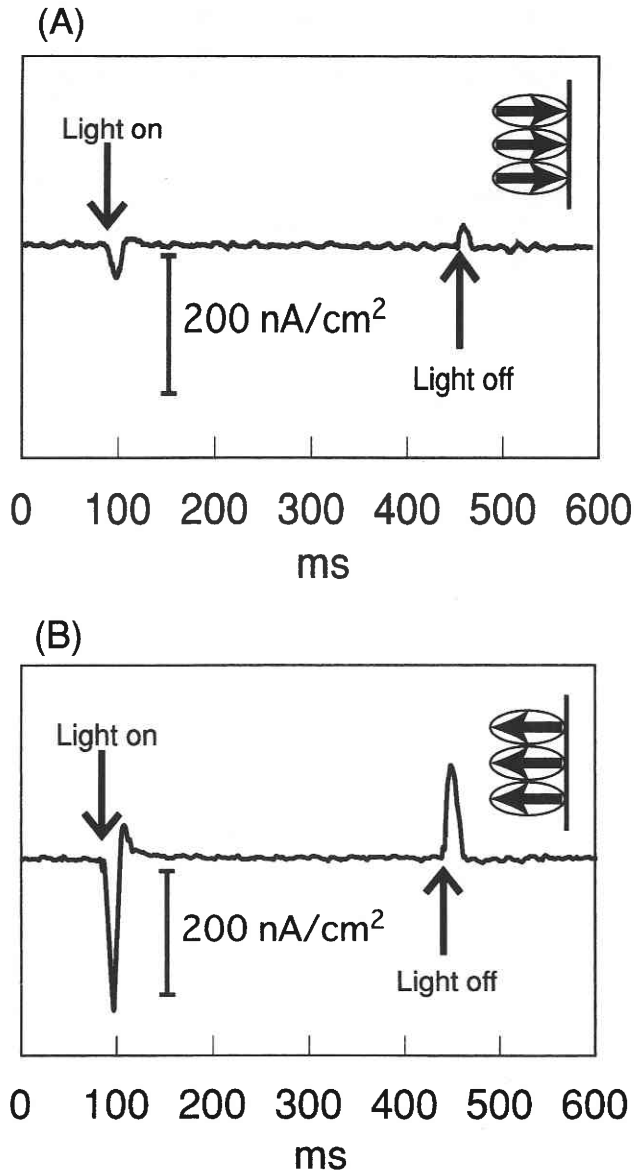


Fig. 4 Photocurrent response patterns from bR oriented monolayers. pH of bR suspension, (A) 7.0; (B) 4.0, electrode potential, 0.0 V vs. Ag/AgCl.

光電流の極性は、bR の分子配向にかかわらず光照射の瞬間にはカソード方向（電極から溶液に負電荷が動く向き）であり、光照射を止めた瞬間にはアノード方向であった。もし光電流応答が分子内部の電荷移動に由来するならば、bR の分子配向の反転でその極性は逆転するはずである。したがって、この結果は光電流が bR 分子内部の電荷移動によるものではないことを示し、われわれが提案している光電流発生メカニズム^{7),8)}を支持する。

また、プロトン放出側が電極を向いた場合 (A) は取り込み側が電極を向いた場合 (B) よりも光電流強度が増大

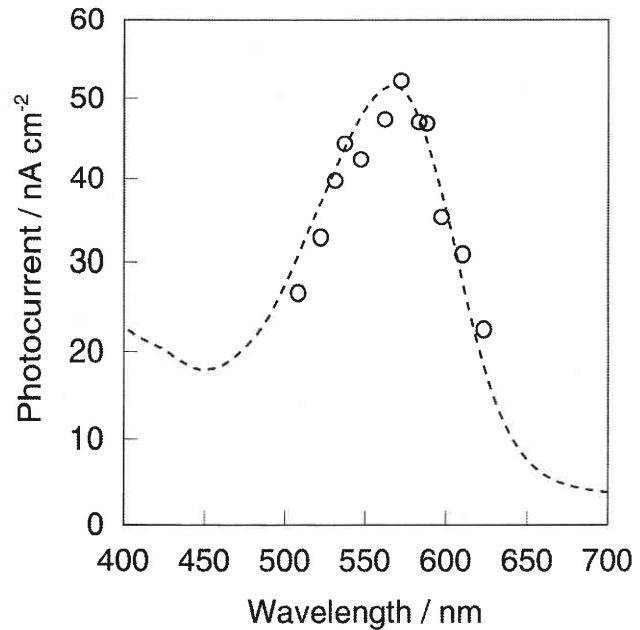


Fig. 5 Photocurrent action spectrum of bR monolayer. pH of bR suspension, 4.0; electrode potential, 0.0 V vs. Ag/AgCl. Broken curve is the absorption spectrum of bR.

し、bR の分子配向が光電流応答の高感度化に寄与する可能性が示唆された。

bR の分子配向と光電流強度に関しては、電着法で作製された bR 配向膜¹²⁾では本稿と同様の結果だったが、抗体を用いて分子配向を制御した bR 単分子膜¹³⁾とは反対の結果になった。これらの結果は固定化方法が異なるため単純に比較できないが、今後、固定化法と光電流応答の対応を明確にする必要があるだろう。また、これまでの研究では、本稿も含めて紫膜の被覆率に関してはあまり考察されていないが、bR 固定化電極の高感度化の検討には被覆率も重要なポイントになると考えられる。これは今後の課題としたい。

4. ま と め

bR の分子配向を制御して電極上に固定化し、光電流応答を測定した。光電流極性は bR の分子配向に影響を受けず、bR 分子内部の電子移動に由来するものではないことが示唆された。また、分子配向が、光電流応答の高感度化に寄与する可能性が示された。

今後、bR の分子配向および被覆率を明確にすることにより、bR 固定化電極の高機能化・高感度化の設計指針が得られることを期待する。

(1999年3月30日受理)

参 考 文 献

- 1) J. K. Lanyi, *Biochim. Biophys. Acta*, **1183**, 241 (1993).
- 2) T. Miyasaka, Y. Maekawa and K. Koyama, *Thin Solid Films*, **180**, 73 (1989).
- 3) T. Miyasaka and K. Koyama, *Chem. Lett.*, 1645 (1991).
- 4) T. Miyasaka, K. Koyama and I. Ito, *Science*, **255**, 342 (1992).
- 5) T. Miyasaka and K. Koyama, *Appl. Opt.*, **32**, 6371 (1993).
- 6) 宮坂力, 小山行一, *応用物理*, **61**, 1053 (1992).
- 7) Y. Saga, T. Watanabe, K. Koyama and T. Miyasaka, *J. Phys. Chem. B*, **103**, 234 (1999).
- 8) Y. Saga, T. Watanabe, K. Koyama and T. Miyasaka, *Anal. Sci.*, **15**, 365 (1999).
- 9) D. Oestehelt and W. Stoeckenius, *Methods Enzymol.*, **31**, 667 (1974).
- 10) K. A. Fisher, *Methods Enzymol.*, **88**, 230 (1982).
- 11) R. Jonas, Y. Koutalos and T. G. Ebrey, *Photochem. Photobiol.*, **52**, 1163 (1990).
- 12) J.-P. Wang, S.-K. Yoo, L. Song and M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B*, **101**, 3420 (1997).
- 13) K. Koyama, N. Yamaguchi and T. Miyasaka, *Science*, **265**, 762 (1994).