

レチナールタンパク質の光電気化学
特性に関する研究

佐賀 佳央

①

レチナールタンパク質の光電気化学
特性に関する研究

東京大学大学院 工学系研究科
化学生命工学専攻

佐賀 佳央

目次

第1章 序論	1
1.1. 本研究の背景	2
1.1.1. 緒言	2
1.1.2. 高度好塩菌	6
1.1.3. バクテリオロドプシン	12
1.1.4. ハロロドプシン	21
1.1.5. 従来のバクテリオロドプシンの光電応答に関する研究	23
1.2. 本研究の目的	29
参考文献	30
第2章 バクテリオロドプシン固定化電極の光電流応答の発生機構	35
2.1. 金電極表面の酸化被膜と光電流応答	36
2.1.1. 緒言	36
2.1.2. 実験方法	38
2.1.3. 結果	40
2.1.4. 考察	50
2.2. 電解質溶液の緩衝能の効果	56
2.2.1. 緒言	56
2.2.2. 実験方法	56
2.2.3. 結果	57
2.2.4. 考察	65
参考文献	74
第3章 バクテリオロドプシンの光電流応答と光反応サイクル	75
3.1. 緒言	76
3.2. 実験方法	77
3.3. 結果	77
3.4. 考察	82
参考文献	87

第4章 バクテリオロドプシンに対する金属イオンの効果	88
4.1. 緒言	89
4.2. 実験方法	91
4.3. 結果	91
4.4. 考察	96
参考文献	100
第5章 バクテリオロドプシンの配向制御固定化と光電流応答	101
5.1. 緒言	102
5.2. 実験方法	104
5.3. 結果	105
5.4. 考察	112
参考文献	115
第6章 ハロロドプシン固定化電極の光電流応答	116
6.1. 緒言	117
6.2. 実験方法	120
6.3. 結果	121
6.4. 考察	125
参考文献	126
第7章 総括	127
Appendix 高度好塩菌の培養とバクテリオロドプシンの精製	132
発表論文リスト	135
謝辞	137

第1章

序論

1.1. 本研究の背景

1.1.1. 緒言

20世紀も終わりに近づいているが、今世紀の科学技術の急速な発展は驚くべきものがある。特にエレクトロニクスの進歩は著しく、物質、エネルギー、そして情報分野と、すべての科学と技術の発展に深く関わり、人類の生活を大きく変えてきた。21世紀はもう目の前だが、来世紀はさらなる高度情報化社会へ展開していくことが予想され、現行のエレクトロニクスの飛躍的發展がその鍵を握る。

しかし、現在の半導体デバイスを中心としたエレクトロニクスは、今大きな問題に直面している。現在のシリコンデバイスはさらに縮小化の方向に向かっているが、物理的、加工技術的、そして経済的にも限界が近づいてきている。すなわち、量子効果的な作動障害、微細加工技術に基づくいわゆるスケーリング問題、そして微小化に伴うドーピングなどの均一性の保証および量産化の問題である。これを克服するため、エレクトロニクス分野では研究を積み重ねているが、解決の見通しは立っていない。

このような状況で現行のシリコンデバイスとは異なる新しい技術の確立の必要性が1980年前後から提唱され、注目を集めるようになった。いわゆるナノエレクトロニクスであり、さらには単一分子を素子として用いるという分子素子の概念である。

分子素子の概念は、素子の縮小化が将来的に分子一個の大きさに到達する可能性をふまえ、逆に一個の分子に基づいて一個の素子を構築するという発想から生まれた。これは、約20年前にCarterによって提唱されたが¹⁾、当時は単一分子にアクセスする方法や基板の微細加工技術が確立されておらず、抽象的な概念に過ぎなかった。しかし、近年、近接場現象を利用した一分子可視化や走査型プローブ顕微鏡、光ピンセットによる単一分子へのアクセスや操作ができるようになってきており、またナノスケールの加工技術も急速に進展していることから、分子デバイス研究の基盤が整いつつあるといえる。

また、生命科学の進歩により、タンパク質や核酸を始めとする生体物質の巧妙な構造や機能が明らかになってきた。このような研究の進展の中で、生体分子の機能解明にとどまらず、生体機能分子を利用もしくは模倣する試みが盛んになりつつある。これは、分子デバイスの概念とも融合することによってバイオエレクトロニクスとして発展している。

バイオエレクトロニクスという分野は学問的にはまだ新しく実用化にはほど遠い段階ではあるが、さまざまな試みが行われている。研究の基本的なポイントとして、

○生体機能分子のスクリーニング ←機能性と安定性→

○固定化・集積化技術の確立とその評価

○デバイスとしての特性評価

などが考えられる。生体分子のスクリーニングは、デバイスとして利用するのに興味深い機能を持っていることは当然のこととして、通常溶液中または細胞膜で働いている分子を固体基板上で機能させなければならないということも重要な点である。また、いかに安定に、分子配向を制御しつつ微細空間 ←究極的には単一分子デバイスとして機能するように→ に集積化するかといった固定化・集積化技術もバイオエレクトロニクスを実現する上で大きなポイントとなる。現在、このような研究が精力的に進められている。

ここで、バイオエレクトロニクス材料として期待されているタンパク質の主な例をTable 1-1に示す²⁾。これらのタンパク質は、主に生体での情報伝達やエネルギー変換を司っており、光、電気などの外部からの働きかけに対して優れた応答性を持っているといえる。したがって、光電変換素子やスイッチ、電子伝達素子として応用されることが期待できる。実際に、これらのタンパク質を用いたデバイス構築が試みられている。

Table 1-1 Possible application of bioelectronic devices.

タンパク質	デバイス
電子伝達系タンパク質	電子メディエーター、コンデンサー
バクテリオロドプシン	光電変換素子、スイッチ
光合成反応中心	光電変換、電子伝達
ATPase	エネルギー変換
抗体	センサー
アクチン、ミオシン	アクチュエーター
酸化還元酵素	スイッチ、電池

本論文で取り上げたバクテリオロドプシン (bR) も、バイオエレクトロニックデバイス材料として期待され、またデバイス構築のための研究が行われているタンパク質である。bRは高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* の膜タンパク質であり、光を吸収することによってプロトンを細胞内側から外側へ輸送する機能を持つ。

bRは以下のような理由から工学的材料にふさわしいと考えられ、バイオエレクトロニックデバイス材料として期待されている。

- bRの光反応が、同じレチナールタンパク質である視物質ロドプシンと異なりサイクル反応であり、繰り返し利用できる
- 非常に安定なタンパク質である
- 純品を容易に大量精製できる

また、本論文の研究対象であるbRとハロロドプシン (hR) は、アミノ酸数にして250残基程度、分子量にして26000程度とイオンポンプとしては最小のサイズであるため、イオンポンプのモデル的存在として多くの分野で基礎的研究

が行われている。光反応サイクル過程で吸収極大が変化し、レチナールがいわば分子内プローブとして働くのも、イオンポンプのメカニズムを探るのに好都合となっている。また、両者共に発色団がレチナールでありその光異性化によって反応が始まることや7本の α ヘリックスが膜貫通型の構造をとることなど、動物の網膜に存在する視物質ロドプシンと多くの共通点を持っている。現在、bRは高い分解能で構造が明らかにされているのに対し、ロドプシンの構造の分解能はまだ低く、分子レベルで議論できるところまで到達していない。このような観点から、bRとロドプシンの類似性に注目した研究も行われている。

以下で、bRとhRが存在する高度好塩菌と、bR、hRについて概観する。

1.1.2. 高度好塩菌

古細菌

本論文で扱うレチナールタンパク質を所有する高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* はメタン細菌、好熱性古細菌とともに古細菌に分類される。

古細菌 (Archaeobacteria) の概念はWoeseとFoxが1977年に提唱した³⁾。1960年代まで細菌は形態、コロニーの形状、グラム染色、基質資化性、栄養要求性、生理的性質などの表現形質によって分類されていた。しかし、このころ多くの生物についてシトクロムcなどのアミノ酸配列の比較を行うと、その類似性は進化系統樹とよく一致することが明らかになり、タンパク質や核酸の一次配列は進化の歴史を記録したものであるという概念が現れてきた⁴⁾。全生物の系統関係を比較するためには、微生物から動物、植物まですべての生物に共通に存在する生体高分子を基準にしなければならない。Woeseは、この基準としてリボソーム小サブユニットのRNA (原核生物では16SrRNA、真核生物では18SrRNA) を選んだ。リボソームはタンパク質合成装置であり、その基本的機構は全生物に共通性がある。また、進化の歴史において共通の機能を担っており、進化のスピードが速すぎることもない。さらに、リボソームは細胞内に多量に存在し、粒子として独立しているので生成も容易である。これらの性質は系統比較の基準となる生体高分子として適していた。

リボソームRNAの解析をさまざまな生物で行ったところ、原核生物であるメタン菌とふつうの細菌 (真性細菌) の間の相同性は、真性細菌と真核生物の間の相同性同様に小さいことが明らかになった。すなわち、メタン菌 (古細菌) と真性細菌は同じ原核生物ではあるが、真性細菌と真核生物くらい系統関係の離れた生物であることを意味する。このような結果に基づいて、Woeseは従来の真核生物と原核生物という分類を改め、真性細菌 (Eubacteria)、真核生物 (Eukaryotes)、古細菌 (Archaeobacteria) の三大生物系統にわけたことを主張し、この概念はその後、古細菌の多くの生化学的特徴が他の生物群と異なることが明確になるに従って、広く支持されるようになった。

Fig. 1-1に全生物界の分子系統樹を示す²⁾。古細菌という名前は非常に原始的な生物を想像させるが、古細菌は真性細菌よりもむしろ真核生物に近い性質を持っている。例えばDNAポリメラーゼが真核生物と類似していることや、翻訳開始のtRNAがフォルミル化していないメチオニルtRNAであることなどである。このことは系統樹からも理解することができる。また、真核生物の枝よりも根元で分岐することからわかるように、古細菌は真核生物に比べて多くの点で原始的で単純な性質を持っている。例えば、細胞内部に膜系や小器官を持たないこと、ゲノムの大きさが真核生物に比べてはるかに小さいこと、細胞複製にかかわる因子の種類がはるかに少ないこと、などである。このような点では真性細菌と差はあまり無く、両者は同程度の進化をしていると考えることができる。これらのことを総合すると、進化の過程でまず真性細菌と古細菌に分岐した後で、両者はそれぞれ独自の性質を獲得していった。その後、真核生物に分岐するときに古細菌の性質を受け継いだ部分と、その後新たに獲得した性質が真核生物にあると考えられる。

現在、古細菌の主な特徴として、以下のことが挙げられる。

- 古細菌は、グリセロールにイソプレノイドアルコールがエーテル結合した脂質骨格を持ち、他の生物が脂肪酸エステルを基本とするのとは対照的である。
- 細胞壁が通常のペプチドグリカンではなく、主に糖タンパク質である。
- 染色体にヒストン様タンパク質があり、クロマチン様構造を形成している。
- 抗生物質に対する感受性が真核生物とも真性細菌とも異なる。
- リボソームがジフテリア毒素によりADPリボシル化され失活する。

古細菌は、メタン生成古細菌、好熱性古細菌、高度好塩菌から成り、本論文の研究対象であるバクテリオロドプシン (bR) とハロロドプシン (hR) を産生する *Halobacterium salinarum* は高度好塩菌に属する。

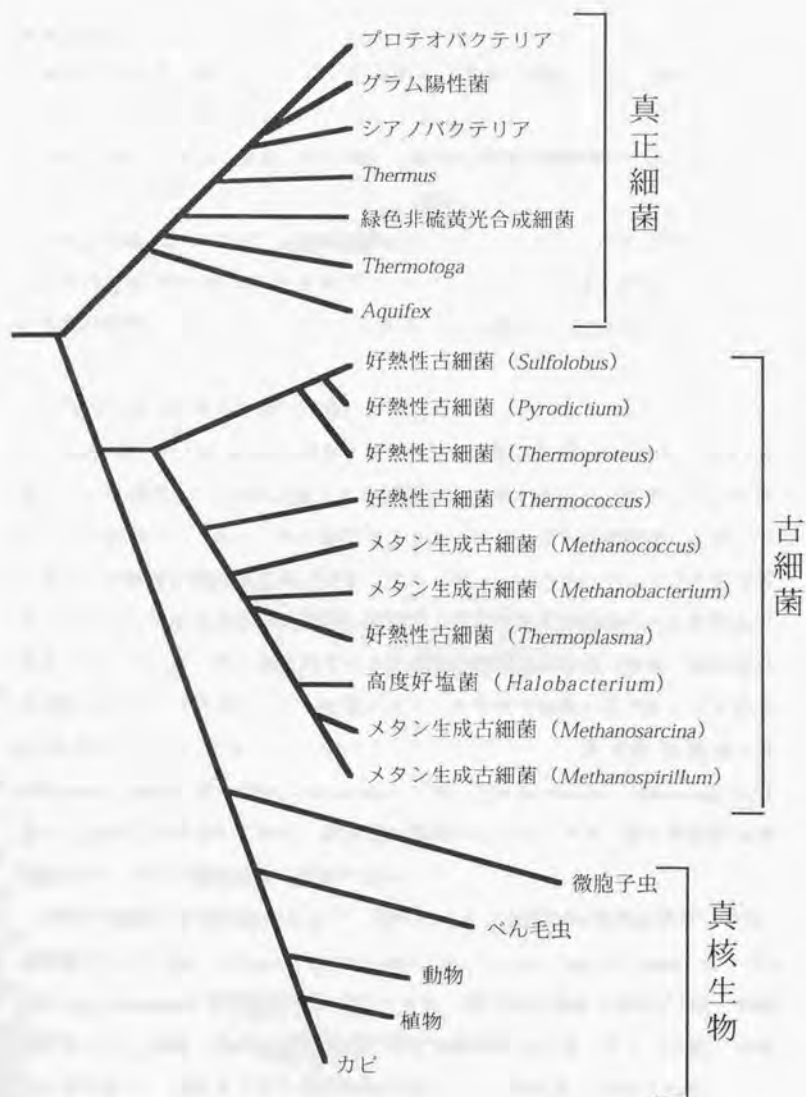


Fig. 1-1 Position of Archaeobacteria in the evolution tree.

高度好塩菌

細菌（古細菌に限らない）は、その増殖に最適な食塩（NaCl）濃度により、次のように分類できる⁶⁾。

○非好塩菌（至適NaCl濃度、0-0.2 M）：ほとんどの土壌細菌がこれにあてはまる。

○低度好塩菌（0.2-0.5 M）：海洋細菌の多くはここに分類されると考えられる。

○中度好塩菌（0.5-2.5 M）：さまざまな含塩試料中から多数分離されている。

○高度好塩菌（2.5-5.2 M）：ほとんど飽和に近い濃度でも生育できる。

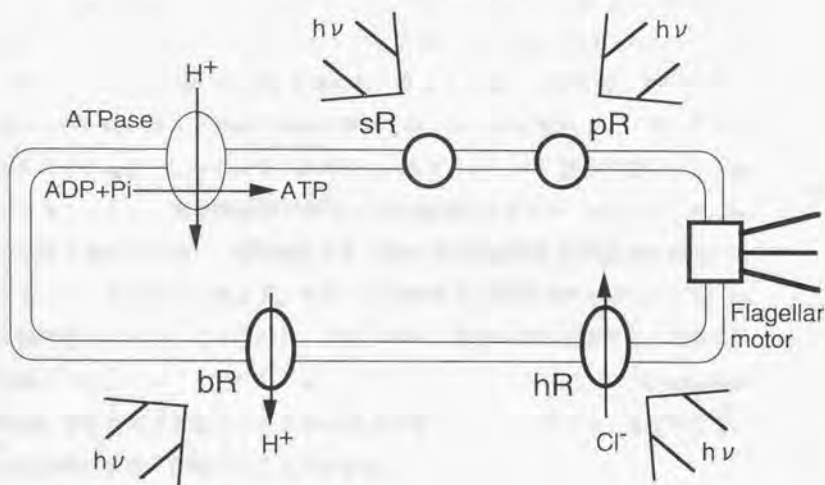
本項では最後の高度好塩菌に関して説明する。

Halobacterium salinarum に代表される高度好塩菌は、繁殖するためにNaCl濃度にして最低でも1.5 Mを必要とする好気性古細菌である。イスラエルの死海やアメリカのグレート・ソルト湖に代表される塩湖、または塩田跡に生育している。この細菌の細胞膜にはバクテリオルベリンというカロテノイド色素が含まれており、そのため多量に繁殖した塩湖・塩田跡はこの色素のため赤紫色に染まっている。古くから知られている天日塩の赤紫色の着色（中国、明の時代に刊行された「本草綱目」にも記載がある）も高度好塩菌のカロテノイド色素に由来するものである。1997年10月の時点で、高度好塩菌は1目（*Halobacteriales*）1科（*Halobacteriaceae*）10属（*Halobacterium*、*Haloarcula*など）として公式に分類されており、多様性の観点からみるとメタン菌や好熱性古細菌に比べ、かなり範囲の狭い菌群である。

高度好塩菌の生理的特徴として、菌体内イオン濃度の特殊性が挙げられる。定常値として、 Na^+ : 0.5 mol / kg cell water、 K^+ : 3.8 mol / kg cell water、 Cl^- : 2.3 mol / kg cell waterという値が報告されており、菌内の K^+ 濃度が菌外の500~1000倍であった。また、他の高度好塩菌に対する殺菌作用を持つタンパク質、ハロシンを生産し、抗菌スペクトルがかなり広いことが明らかにされている。

高度好塩菌 *Halobacterium salinarium* に存在するレチナールタンパク質

高度好塩菌 *Halobacterium salinarium* の細胞膜には4種類のレチナールタンパク質が存在し、そのうち2種類は光駆動型イオンポンプとして、残りの2種類がこの菌の走行性にかかわる、いわば光センサーとして機能している。Fig. 1-2に *Halobacterium salinarium* の模式図を示す。2種類は光駆動型イオンポンプはプロトンを輸送するバクテリオロドプシン (bR) と塩化物イオンを輸送するハロロドプシン (hR) であり、2種類の光センサーはセンサリーロドプシン (sRまたはsRI) とフォボロドプシン (pRまたはsRII) である。



bR: Bacteriorhodopsin	Light-driven proton pump
hR: Halorhodopsin	Light-driven chloride pump
sR: Sensoryrhodopsin	Light receptor
pR: Phoborhodopsin	Light receptor

Fig. 1-2 Various light conversion schemes in *H. salinarium*

bRは光吸収によって細胞膜内側から外側へプロトンを輸送する機能を持ち¹³⁾、hRは細胞膜外側から内側へ塩化物イオンを輸送する機能を持つ¹⁴⁾。したがって、両者ともに光エネルギーを膜を介した電気化学ポテンシャルに変換する。*H. salinarium*は好氣的条件下では酸素呼吸で生きているが、嫌氣的条件下では形成された電気化学ポテンシャルがATP合成酵素を駆動することにより生きるためのエネルギーを得る。このような観点から考えると、*H. salinarium*は広義の光合成を行う生物であるといえる。

sRとpRは*H. salinarium*の光センサーとして、適当な波長の光のもとに集まったり、不適当な波長の光から遠ざかったりする「走行性」に関与している。sRは587 nmに吸収極大を持ち、オレンジ光に対して正の走行性を示す^{12,13)}。それに対し、pRは487 nmに吸収極大を持ち、青色光に対して負の走行性を示す¹⁴⁾。酸素分圧が高い条件下ではsRは発現が抑制され、pRのみが発現している。生きるために光を必要としないので、ただ光によるダメージを回避して暗いほうへ移動する。しかし、酸素分圧が下がるとsRの発現が促進され（あわせてbR、hRの発現も促進される）、光駆動型イオンポンプを働かせるため適切な環境であるオレンジ光のもとに集まる。また、sRの光反応中間体であるsR373（373 nmに吸収極大を持つ）は比較的長い寿命を持ち、青色光の光受容体として負の走行性をつかさどる。すなわち、sRが2通りの役割を果たすことで、*H. salinarium*は菌に害を及ぼす可能性のある短波長光を避けながらエネルギーを産生するために適切な環境へ移動することができる。

*H. salinarium*に存在するこれら4種類のタンパク質のアミノ酸配列を比較すると、明らかな相同性がみられ（Table 1-2）、共通祖先レチナールタンパク質から分化した可能性が考えられる。構造上も、7本の α ヘリックスから形成され、7番目のヘリックス中央付近に位置するリジン残基とレチナールがシッフ塩基結合しているという共通点がある。これらのタンパク質の系統は、どのようにして光エネルギー変換と光情報伝達の機能を持つタンパク質に分かれていったのか、レチナールタンパク質の進化を考えるうえで興味深い。

Table 1-2 Homology of retinal proteins in *H. salinarium*.

	Bacteriorhodopsin		
Halorhodopsin	34.5%	Halorhodopsin	
Sensory rhodopsin	27.0%	28.8%	Sensory rhodopsin
Phoborhodopsin	30.8%	31.1%	33.0%

1.1.3. バクテリオロドプシン

バクテリオロドプシン (bR) は光吸収によってプロトンを細胞膜内側から外側へ輸送する機能を持つ⁷⁽¹⁰⁾。bRは発色団としてオールトランスレチナールを持ち、その光異性化によってプロトン輸送が始まる。このプロトン輸送過程は、10ミリ秒程度でもとの基底状態に戻るサイクル反応である。

bRは分子量が26700と小さく、最も単純なイオンポンプであるといえる。また、プロトン輸送過程でbRの吸収極大が変化し、レチナールはいわばプローブとして働いているため、プロトン輸送過程における中間体をとらえることができる。これらの性質により、イオンポンプのモデル的存在として多くの分野で研究が行われてきた。また、動物の網膜に存在する視物質ロドプシンとの類似性からも、多くの興味を引いてきた。さらに、その光機能性やたぐいまれな安定性から、光デバイスへの応用も試みられている。本節では、bRの基本的性質について概観する。

構造

膜タンパク質は一般に結晶化しにくく、X線回折による立体構造の決定がむずかしいため、今まで立体構造が明らかになった膜タンパク質は少ない。そのなかで、bRは早くから立体構造に関する情報が得られてきた膜タンパク質であ

る。

bRは紫膜の中で二次元結晶として存在している。これに注目したHendersonとUnwinは1975年、斜方向低温電子顕微鏡像の高分解能三次元再構成によりbRが7本の膜貫通型 α -ヘリックスからなることを明らかにした¹⁵⁾。この分解能7Åのモデルは膜タンパク質の構造に関するはじめての有用な知見となった。このグループはさらに研究を進め、1990年に分解能3.5Åの構造が¹⁶⁾、1996年にはさらに詳細な構造が報告された¹⁷⁾。1997年には、木村らはヘリックス間をつなぐループ部分も明確にした構造を発表した¹⁸⁾。この報告では、電子線の特性を活かしてアミノ酸残基の荷電状態の情報も得て、タンパク質表面に存在する酸性アミノ酸が漏斗のようにプロトンを集めていることを提案した。さらに、最近になって相次いでX線回折によって高分解能の構造が報告された。PeyroulaらははじめてbRのX線構造解析に成功し、2.5Å分解能の構造を報告した¹⁹⁾。報告された構造では、はじめてタンパク質内に存在する数個の水分子の位置が同定された。また、Lanyiらは2.3Å分解能の構造を報告し²⁰⁾、プロトン輸送経路に存在するアミノ酸残基と水分子の水素結合ネットワークを明らかにしている。このようにbRの静的構造は含有する水分子も含めて原子レベルで議論できるようになりつつある。

Fig. 1-3にbRの構造模式図を示す。7本の膜貫通 α -ヘリックスがレチナールを取り囲む構造をとっており、この基本構造は視物質ロドプシン、アイオドプシンに共通である。ヘリックスB、C、Dは膜面にほぼ垂直であり、ヘリックスA、E、F、Gは膜面への法線から約10°～20°ほど傾いている。bRの発色団であるオールトランスレチナールは216番目のアミノ酸リジン(Lys-216)とシッフ塩基結合している。85番目のアスパラギン酸(Asp-85)はレチナールシッフ塩基の下部に位置し、シッフ塩基からのプロトンアクセプターとして機能している。また、96番目のアスパラギン酸(Asp-96)はレチナールシッフ塩基の上部に位置し、シッフ塩基へのプロトンドナーとして機能している。チャネル内では、さまざまなアミノ酸残基と水分子が水素結合系を形成している。

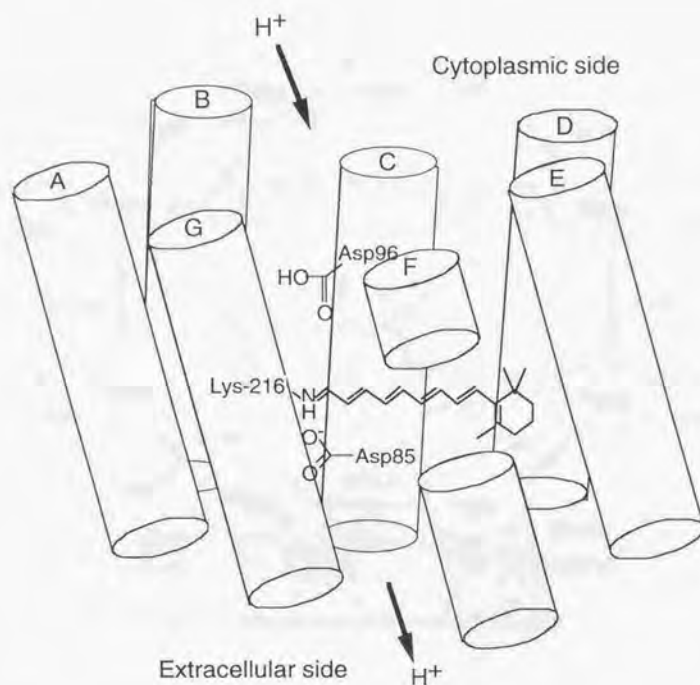


Fig. 1-3 Molecular structure of bacteriorhodopsin.

光反応サイクル

bRの光反応サイクルはオールトランスレチナールの13シス型への光異性化により始まる。光反応サイクルは、時間分解分光法や極低温における吸収測定などで研究が進められ、吸収極大が異なるさまざまな中間体が同定されている。Fig. 1-4に中性でのbRの光反応サイクルを示す。光異性化後に最初に観測され

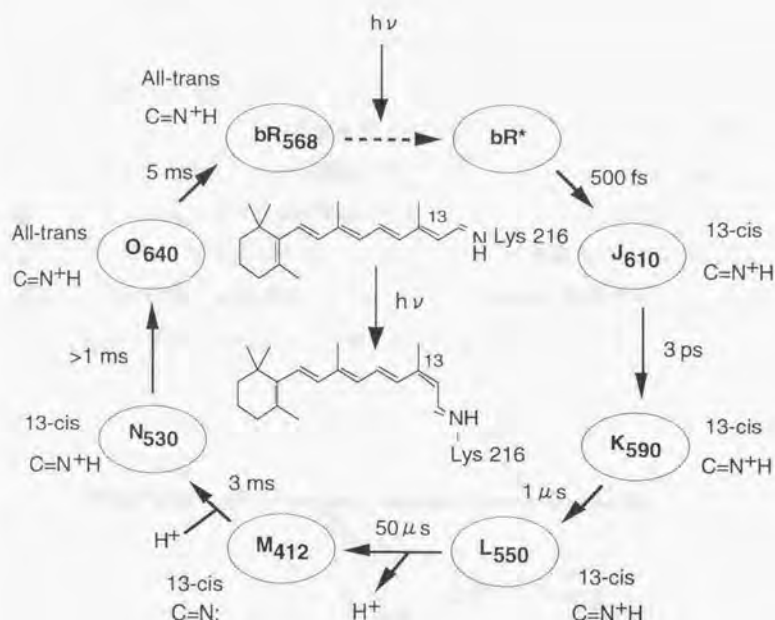


Fig. 1-4 Photocycle of bacteriorhodopsin.

る中間体はJ中間体であり、基底状態より長波長側に吸収極大を持つ^{21,24)}。この中間体は極低温でも安定化することはできない。以降、準安定なK中間体が生成し^{25,27)}、さらにはタンパク質の構造変化が起こる過程でL中間体、M中間体へと変化する^{28,31)}。L→Mの過程でシッフ塩基上に存在したプロトンが85番目のアスパラギン酸 (Asp-85) に移動する。このシッフ塩基の脱プロトン化のため、M中間体は他の中間体に比べ短波長 (412 nm) にシフトする。そのため、光反応サイクル過程においてM中間体は検出しやすく、時間分解分光法ではプローブ的な役割を果たすことが多い。M中間体生成時に細胞外へのプロトン放出が起こり、その減衰時に細胞内側からプロトンの取り込みが起こる。そののち、

レチナールが13シス型でシッフ塩基が再プロトン化したN中間体^(0.31)、レチナールがオールトランス型に戻っているがタンパク質の構造がもとに戻っていないO中間体を経て、最初のbRに戻る。

Fig. 1-5に示すようにbRの光反応サイクルはpHに大きく依存する⁽¹⁾。酸性のときはプロトン放出がL→Mの過程で起こらず、プロトン取り込みが起こった後、O→bRの過程でプロトンが放出される。それに対し、アルカリ性では光反応サイクル後半、すなわちプロトンの取り込み遅くなる傾向にある。そのため、低pHではO中間体の蓄積が起こり、高pHではN中間体の蓄積が起こる⁽²⁾。このbR光反応サイクルのpH依存性は3章に関連する。

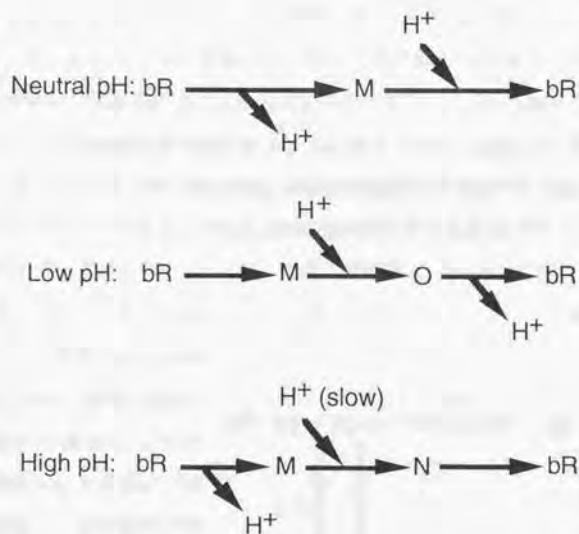


Fig. 1-5 Simplified bR photocycles at neutral, low and high pH.

プロトン輸送経路

bRのプロトン輸送は、分子内部に存在するアミノ酸残基と水を介したプロトンリレーであると考えられている。プロトン輸送に関わるアミノ酸の同定は、遺伝子工学的に特定のアミノ酸を別のアミノ酸に変換した変異bRのプロトンポンプ活性測定や分光学的測定により行われてきた。現在、提案されているプロトン輸送経路模式図をFig. 1-6に示す。レチナールの下部に位置する85番目のアスパラギン酸 (Asp-85) はシッフ塩基からのプロトンのアクセプターとして、レチナールの上部に位置する96番目のアスパラギン酸 (Asp-96) はシッフ塩基へのプロトンドナーとして機能する。

放出チャネルでは、シッフ塩基からAsp-85を介してタンパク質表面に至る連続的な水素結合系がチャネル内部に存在する水分子も参加することにより形成されている。レチナールの光異性化によって引き起こされるタンパク質の構造変化で水素結合系が切れるとAsp-85のpKaが上昇し、L→Mの過程でシッフ塩基のプロトンがAsp-85に受け渡される。Asp-85とプロトン放出口付近に存在する204番目のグルタミン酸 (Glu-204) のpKaは連動しており^{32,33)} (Fig. 1-7)、このAsp-85のプロトン化によってGlu-204のpKaが低下するためプロトンが解離し、194番目のグルタミン酸 (Glu-194) を経て細胞外にプロトンを放出する³⁴⁾。

一方、プロトン取り込みチャネルは疎水的環境であり、シッフ塩基へのプロトンドナーであるAsp-96のpKaは11以上と非常に高い。M中間体の減衰とともにAsp-96はシッフ塩基にプロトンを渡し、その後分子外部からプロトンを受け取る。このとき、取り込みチャネルが外部環境と接続できるようにヘリックスFが

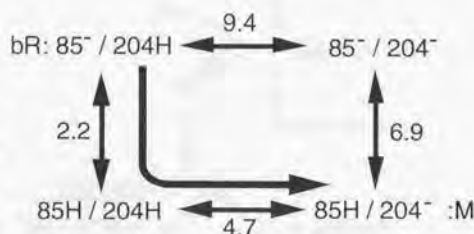


Fig. 1-7 Two pK_a's of Asp-85 and Glu-204.

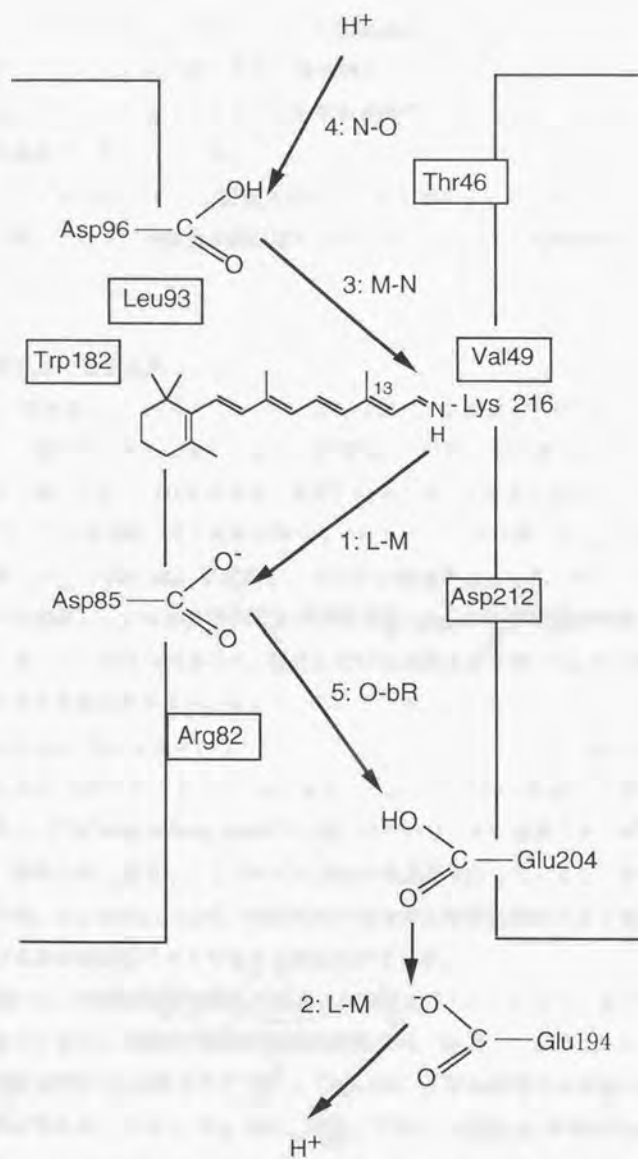


Fig. 1-6 Proton pathway and role of specific amino acids in the proton function.

開くような動きで大きく移動することがX線回折によって示されている^{35,36)}。この動きによってAsp-96周囲の環境が親水的になり、そのpKaが低下すると考えられる。また、取り込みチャネルにも水分子が存在し、水素結合系を形成している可能性が示唆されている。

このようにbRのプロトン輸送メカニズムは明確になりつつあるが、まだ疑問点も残っており、今後電子線回折や赤外分光法を中心とした再検討が必要であらう。

bRに結合している金属イオン

bRには通常2価の金属イオン (Ca^{2+} または Mg^{2+}) が結合しており、これを取り除くと紫色から青色に変化することが知られている。bRに結合している金属イオンに関しては、1984年の木村の報告³⁷⁾ 以来、多くの研究が行われている。

結合している金属イオンを取り除くことによって、bRは紫 ($\lambda_{\text{max}} = 568 \text{ nm}$) から青 ($\lambda_{\text{max}} = 605 \text{ nm}$) に変化し、プロトン輸送がおこらない^{38,39)}。これは、紫膜では解離している85番目のアスパラギン酸 (Asp-85) が青膜の状態ではプロトン化しているからである⁴⁰⁾。結合している金属イオンは、Asp-85が解離状態のときの負電荷を静電的に安定化していると考えられる。

bRと Ca^{2+} の結合定数を測定したところ、2つのhigh affinity site ($K_1 = 3.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, $K_2 = 6.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) と4-6つのlow affinity site ($K_3 = 3.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) の存在が示された⁴⁰⁾。2つのhigh affinity siteのうち低いほうのサイトに金属イオンが結合すると、紫から青に変化し、このサイトがbRの色調節を行っていることが示唆されている。low affinity siteは、紫膜表面の負電荷との相互作用により弱く結合している非特異的なサイトであると考えられている。

金属イオンの結合位置に関しては多くの研究が行われてきたが、まだ明らかになっていない。最新の ^{13}C 固体NMRの結果では、金属イオンがプロトン放出口付近に存在する196番目のアラニン (Ala-196) と相互作用する位置に存在する結果が得られている⁴¹⁾ (Fig. 1-8)。また、プロトン放出口に存在する4個のグ

ルタミン酸をグルタミンに置換すると、結合定数に大きな影響を与えることも報告されている⁴²⁾。これらの結果を過去の報告とあわせて考えると、プロトン放出口付近にhigh affinity siteのうちの二ヶ所が存在する可能性が高い。

金属イオンがbRのプロトン輸送においてどのような役割を果たしているかは明らかではない。現在考えられているプロトンポンプのメカニズムでは金属イオンは全く考慮されていない風潮だが、それでいいのかは疑問である。本論文では、4章で金属イオンとプロトンポンプの関係について考察を行う。

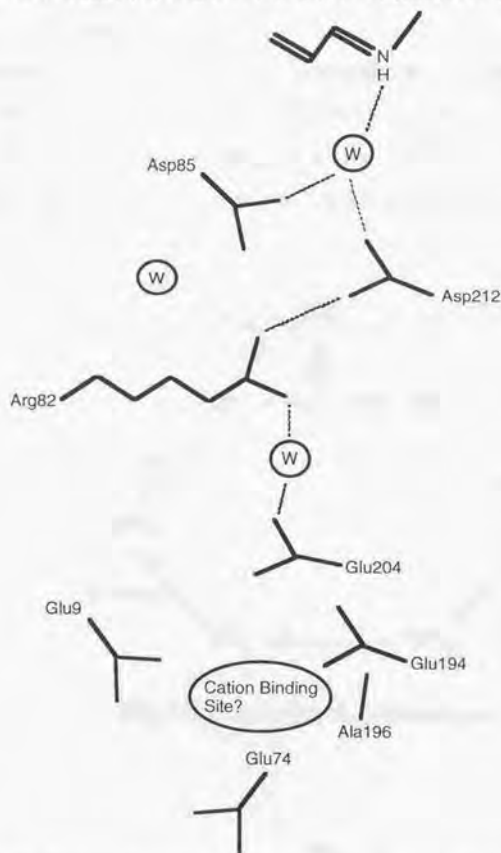


Fig. 1-8 Proposed cation binding site at an extracellular region of bR.

1.1.4. ハロロドプシン

ハロロドプシン (hR) は *Halobacterium salinarium* に存在する第二のイオンポンプである。1970年代後半、bRを欠損した *H. salinarium* でも、光照射によるATP合成が起こること⁴³⁾ や光に依存したプロトンの受動的な取り込み^{44, 45)} が見出し、第二の光駆動型イオンポンプの存在が指摘された。当初、このイオンポンプ (hR) はナトリウムイオンポンプであろうと解釈されていたが、1982年に Schobert と Lanyi が hR は塩化物イオンであることを証明した⁴⁶⁾ (発表された論文名は "Halorhodopsin is a light-driven chloride pump")。

hR は光吸収によって塩化物イオンを細胞膜外側から内側へ輸送する機能を持つ。発色団は bR 同様オールトランスレチナールであり、7回膜貫通型 α -ヘリックスからなる。hR は bR との類似性やレチナールの分子内プローブとしての働きから、他のアニオンポンプやチャネルよりも研究が進んでいる。

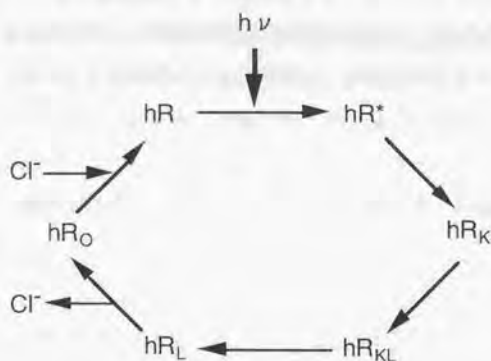


Fig. 1-9 Photocycle of halorhodopsin

hRの一般的な光反応サイクルをFig. 1-9に示す^{1),47),48)}。hRの光反応サイクルでbRと大きく違うのは、hRではシッフ塩基のプロトンが光反応サイクルの間ではずれないので、bRのM中間体に対応するような吸収極大が大きく短波長側にシフトした中間体は観測されない。これは、bRでシッフ塩基のプロトンアクセプターに対応するAsp-85がhRではスレオニンに置換されていることによって、シッフ塩基上のプロトンが解離できないためである。

hRには、bRのAsp-85、Asp-96に対応するようなプロトンアクセプターやドナーが存在しないが、アジドイオン (N_3^-) を添加するとこれがチャンネル内でプロトンアクセプターやドナーの役割を果たし、シッフ塩基からプロトンが解離した短波長に吸収極大を持つ中間体が観測されるとともにhRがプロトンを輸送することが最近報告されている^{49),50)}。これは、bRとhRの間に共通のポンプ機構が存在する可能性を示唆し、注目すべき性質である。この、アジドイオン共存によるhRのプロトン輸送は6章に関連する。

hRは陰イオンである塩化物イオンを輸送するため、チャンネル内で正に荷電しうるアミノ酸残基がポンプ機能に重要な役割を果たしていると考えられる。アミノ酸残基を置換した変異体による研究では、95番目のヒスチジン (His-95) や108番目のアルギニン (Arg-108) が塩化物イオン輸送に関与している可能性が指摘されている^{3),31)}。しかし、hRはbRに比べて研究が遅れており、今後さまざまな方面から研究を進めていくことにより、塩化物イオンの輸送機構の解明が期待される。

1.1.5. 従来のバクテリオロドプシンの光電応答に関する研究

bRの固定化に関する研究の歴史の概要

bR固定化はさまざまな方法で行われている。これまで行われたbR固定化法の主な例を簡単にTable 1-3に示し、以下にその一部を簡単に紹介する。

Table 1-3 Proposed methods for bR immobilization.

固定化法	年	報告者
○リン脂質平面膜への再構成	1981	Bamberg et. al. [52]
	1988	Braun et al. [53]
○LB法	1977	Hwang et al. [54]
	1985	Schildkraut and Lewis [55]
	1986	Furuno et al. [56]
	1989	Miyasaka et al. [57]
	1991	Miyasaka and Koyama [58]
○電着法	1978	Nagy [59]
	1983	Varo [60]
	1984	Groma et al. [61]
	1986	Kononenko et al. [62]
○ポリリジンを介した吸着	1978	Fisher et. al. [63]
	1981	Kouyama et. al. [64]
	1982	Fisher [65]
	1988	Otomo et. al. [66]
○ポリアクリルアミドゲル への取り込み	1988	Liu and Ebrey [67]
	1990	Liu [68]
	1998	Misra [69]
○抗体を利用	1994	Koyama et al. [70]

bRのプロトン輸送を直接検出することによる応答

bRはプロトンポンプとしての機能を持っているので、そのプロトン放出・取り込みを検出することは当然であるが重要な意味を持つ。bRをベシクルに取り込ませ、光照射によるベシクル懸濁液のpH変化をpH電極を用いて測定する方法は、最も一般的なプロトンポンプ活性測定法として広く用いられている。このようなプロトンを直接検出することによる光電応答として、リン脂質平面膜へのbRの再構成^{32,33)}やISFET⁷⁰⁾を用いた研究例がある。

イオンポンプは生体膜という場に埋め込まれてはじめて機能を発揮する。このようなイオンポンプの機能を調べるには、酵素反応のような水溶液系では不十分である。そこで、研究対象のイオンポンプをリン脂質に組み込む方法がよく用いられる。bRについてもリン脂質平面膜再構成による研究が行われている。bRを埋め込んだ脂質二分子膜の両側に電極を入れて定常光を照射したところ、膜を透過するプロトンによる定常電流が観測された³³⁾ (Fig. 1-10A)。膜の両側に印加した電圧と電流の関係はFig. 1-10Bようになる。プロトン輸送による電流が膜両側の電圧に大きく依存するのは、律速段階であるシッフ塩基の再プロトン化が静電力の影響を受けることを示唆する。

また、イオン感応性電解効果型トランジスター (ISFET) はイオン選択性にすぐれ、小型化も容易であることから、センサー素子として注目を集めている。このISFETのゲート上に形成された多孔質アセチルセルロース薄膜にbRを取り込み、bRが放出するプロトンの検出を行った⁷⁰⁾。光照射を行うと、Fig. 1-11のような出力電位の変化が観測された。出力電位はプロトン濃度を反映し、光照射を続けると電位はプロトン濃度が上昇する向きに変化した。これは、bRとISFETの特性を生かした光デバイスといえ、注目すべき試みであろう。

サンドイッチ型セルによるbR配向膜の光電応答 -bR分子内部の電荷移動-

bR配向膜のパルス光励起により発生する電気シグナルに関しては主に1980年代に多くの研究が行われている。電着法^{39,42)}や、ポリアクリルアミドゲル中

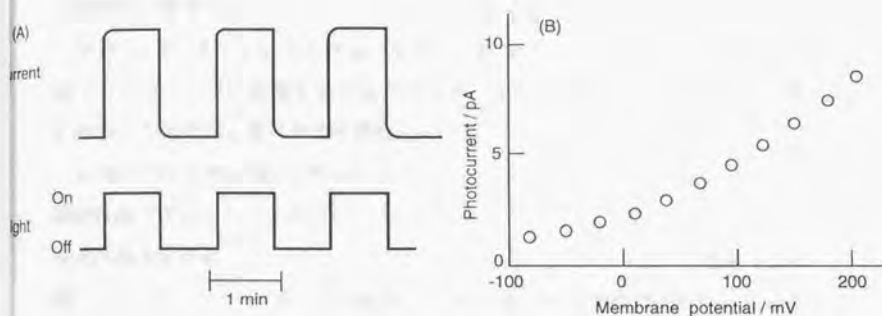


Fig. 1-10 Photocurrents from a planer lipid bilayer containing oriented bR. (A) photocurrents in response to saturated light pulses. (B) Voltage dependence of the photocurrent recorded from the same membrane.

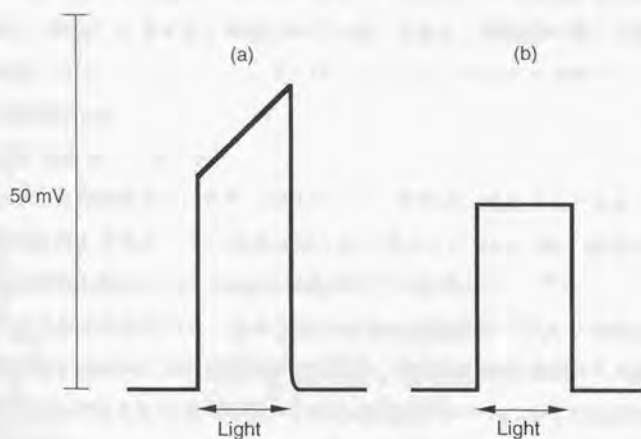


Fig. 1-11 Typical photoresponse of bacteriorhodopsin-immobilized ISFET (a) and after bR bleaching by 200 mM hydroxylamine hydrochloride (b).

のbRに電場印加を行うこと^[7,60]などによって作製されたbR配向膜を2枚の電極ではさみパルス光で励起すると、ピコ秒領域で観測される成分 (B1)、マイクロ秒領域で観測される成分 (B2)、そしてミリ秒領域で観測される成分 (B3)と少なくとも3成分が観測される。なお、これらのシグナルはbRの分子配向が揃っていないときは観測することができず、本論文で解析した電極-溶液界面のbRからの光電流応答と大きく異なる点である。

B1成分はその時定数が100 ps以下であり、シグナルの由来となっている正電荷の移動方向はプロトン輸送の方向とは逆である^[1,72]。したがって、B2やB3成分とは極性が反転している。光異性化がおこらないようにI3位の二重結合を環状にしたレチナール誘導体を再構成したbRではB1成分が観測されなくなること^[73]から、B1成分はレチナールの光異性化の際のシッフ塩基上の正電荷の移動に由来すると考えられている。

B2成分は40 μ s ~ 100 μ s程度の時定数を持ち、bRの光反応サイクルではL中間体からM中間体への過程と対応している^[7,68,74,75]。B2成分を引き起こす正電荷の動きはプロトン輸送の方向と一致し、一般的にシッフ塩基からAsp-85へのプロトン移動に由来すると推測されている。しかし、B2成分にはこのほかに分子外部へのプロトン放出に由来する成分が存在する可能性も示唆されており、ごく最近Misraはプロトンを正常に放出できない、204番目のグルタミン酸 (Glu-204) を置換した変異体を用いて、外部へのプロトン放出がB2成分に一部寄与している可能性を示した^[76]。B3成分はミリ秒領域で観測され光反応サイクルの後半と対応するが、その由来は明らかになっていない。B2、B3成分に関しては、その由来はいまだに明確な結論がでていない。

これまでの研究では、各シグナルとbRの光反応サイクルとの対応から主にシグナルの起源について推測されており、電気化学的な側面からの研究が不足していると考えられる。今後、そのようなアプローチによってbRの光電応答の起源に関してさらに明らかにされることが期待される。

電極-溶液界面のbRの光電流応答

1989年から、宮坂、小山グループ（富士写真フィルム）はbRを SnO_2 電極に固定化し、それを電解質溶液（または電解質ゲル）に接した状態にして、光電流応答の観測を試みた^{57,58,70,76,78)}。

作製したbR電気化学セルに定常光を照射すると、Fig. 1-12に示すように光照射の瞬間と光照射をやめた瞬間にのみ一過性の光電流が発生し、その間は電流が観測されなかった。従来型の光センサーが入射光パターンに忠実に応答するのに対し、このセルは一定光量に対しては応答せず、光量が変わったときにのみ光電流を発生するするという時間微分型応答をする。

この特徴的なbRの光電流応答を利用して、視覚センサーの作製が行われた^{79,77)}。256ピクセル（1ピクセルは1.3 mm角）のITO（酸化インジウム・スズ）基板にbRを固定化し、高分子電解質ゲル層を対極ではさんで、それぞれのピクセルが独立した並列回路を作製した。各ピクセルで生じる光電流を電圧に変換したのち増幅し、表示用の発光ダイオード（LED）に出力される。

スライドプロジェクターからセンサーに動画映像を入射すると、その動画の輪郭が出力される（Fig. 1-13A）。しかし、静止した映像を入射しても、センサーからは何も出力されない（Fig. 1-13B）。すなわち、この視覚センサーは、視覚の動画抽出機能と輪郭強調機能を模倣しているといえる。これは、電極-溶液界面のbRが光強度の変化にのみ応答することをうまく利用しており、bRを利用し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。

現在広く用いられているCCDなどの固体素子を用いたイメージセンサーで輪郭強調、動画抽出などの複雑な画像処理を高等動物の視覚系のように実時間で行うことは容易ではない。それに対して、このようにbRは大がかりな演算回路を用いず素子レベルで視覚系のような画像処理を行うことができるといえ、人工網膜への応用も期待できる。

また、このグループはbRのC末端（プロトン取り込み側）とN末端（プロトン放出側）を認識するモノクローナル抗体を用いて、bRのLB膜の配向を電子

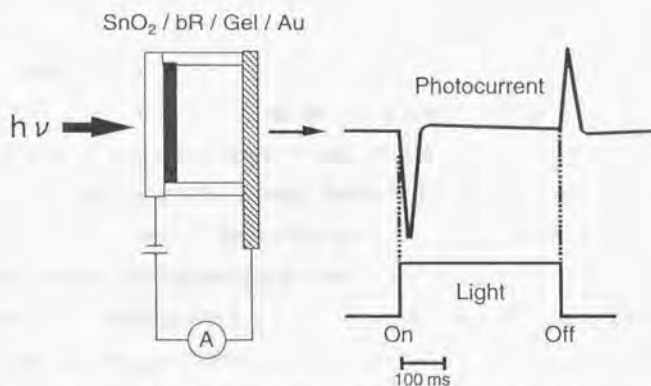


Fig. 1-12 Structure of bR-immobilized thin sandwich-type photocell (left) and photoelectrochemical response of the photocell.

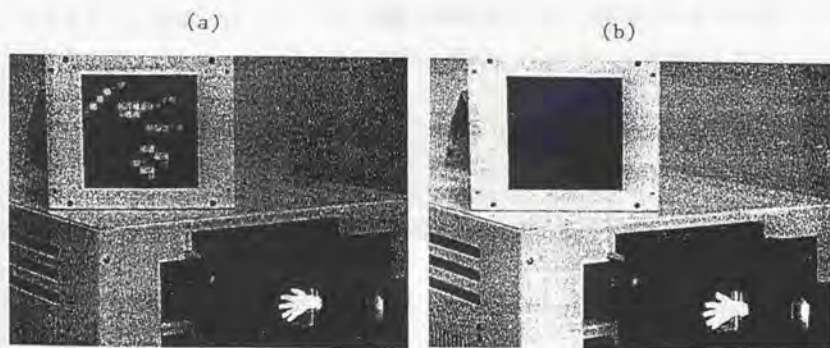


Fig. 1-13 Detection of a moving hand by the 256-pixel bR-based photoreceptor. (a) When the hand starts to jiggle. (b) When the hand stopped its motion.

顕微鏡により観察し、その配向がランダムであることを示した⁷⁸⁾。これを発展させ、Bispecific (BS) 抗体を利用した配向制御に成功した⁷⁹⁾。プロトン放出側を電極に向けたbR配向膜と取り込み側を電極に向けたbR配向膜の光電流応答を調べ、プロトン取り込み側を電極に向けた場合のほうが大きな応答が得られることを示した (5章で詳しく述べる)。

1.2. 本研究の目的

bRは光デバイス材料としても魅力的であると考えられ、前節で述べたようにbRのユニークな光電気化学特性を利用した視覚センサーも作製されている。また、bRの光電応答はプロトン輸送に関する有用な情報を提示する可能性があると考えられる。しかし、現在は現象論が先行している状況であり、電極-溶液界面のbRの微分型光電流応答の発生機構は明らかではない。

本論文では、電極-溶液界面のbRからの微分型光電流応答の発生機構解明とそれに基づいた光電流応答の応用を目的として研究を行った。また、これまでのbRの光電応答に関する研究を振り返ると、bRからの光電シグナルの発生源がbRの光反応サイクルとの対応のみから議論されることが多く、物理化学的・電気化学的な視点からの研究が欠けていると考えられる。そこで本論文では、これまでとは異なったアプローチで電極-溶液界面のbRの光電流応答特性の解析を行った。さらに、hRの光電流応答測定も試み、bR以外にも光電流応答が利用できる可能性を模索した。

なお、本論文では、過去の多くの研究と同様に精製した紫膜から脂質を取り除くことなくbRとして使用した。したがって、本論文でとくに断らない場合は紫膜固定化電極をbR固定化電極として実験を行っている。

参考文献

- 1) F. L. Carter Ed: "Molecular Electronic Devices" (1982).
- 2) 軽部征夫, 民谷栄一編: "バイオエレクトロニクス" (1994).
- 3) C. R. Woese and G. E. Fox, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **74**, 5088-5090 (1977).
- 4) E. Zuckerkandl and L. Pauling, *J. Theoret. Biol.*, **8**, 357-366 (1965).
- 5) C. R. Woese, O. Kandler and M. L. Wheelis, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **87**, 4576-4579 (1990).
- 6) 古賀洋介, 亀倉正博編: "古細菌の生物学" (1998).
- 7) R. A. Mathies, S. W. Lin, J. B. Ames and W. T. Pollard, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **20**, 491-518 (1991).
- 8) K. J. Rothschild, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **24**, 147-167 (1992).
- 9) J. K. Lanyi, *Biochim. Biophys. Acta*, **1183**, 241-261 (1993).
- 10) H. G. Khorana, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1166-1171 (1993).
- 11) J. K. Lanyi, *Physiol. Rev.*, **70**, 319-330 (1990).
- 12) M. Tuda, N. Hazemoto, M. Kondow, N. Kamo, Y. Kobatake and Y. Terayama, *Biochem. Biophys. Chem. Commun.*, **108**, 970-976 (1982).
- 13) R. L. Bogomolni and J. L. Spudis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6250-6254 (1982).
- 14) T. Takahashi, Y. Mochizuki, N. Kamo and Y. Kobatake, *Biochem. Biophys. Chem. Commun.*, **127**, 99-105 (1985).
- 15) R. Henderson and P. N. T. Unwin, *Nature*, **257**, 28-32 (1975).
- 16) R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann and K. H. Downing, *J. Mol. Biol.*, **213**, 899-929 (1990).
- 17) N. Grigorieff, T. A. Ceska, K. H. Downing, J. M. Baldwin and R. Henderson, *J. Mol. Biol.*, **259**, 393-421 (1996).
- 18) Y. Kimura, D. G. Vassilyev, A. Miyazawa, A. Kidera, M. Matsushima, K. Mitsuoka, K. Murata, T. Hirai and Y. Fujiyoshi, *Nature*, **389**, 206-211 (1997).

- 19) E. P. Peyroula, G. Rummel, J. P. Rosenbusch and E. M. Landau, *Science*, **277**, 1676-1681 (1997).
- 20) H. Luecke, H. -T. Richter and J. K. Lanyi, *Science*, **280**, 1934-1937 (1998).
- 21) M. L. Applebury, K. S. Peters and P. M. Rentzepis, *Biophys. J.*, **23**, 375-382 (1978).
- 22) J. -M. Fang, J. D. Carriker, V. Bologh-Nair and K. Nakanishi, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 5162-5164 (1983).
- 23) H. -J. Polland, M. A. Frantz, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kolling and D. Oesterhelt, *Biochim. Biophys. Acta*, **767**, 635-639 (1984).
- 24) H. -J. Polland, M. A. Frantz, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kolling and D. Oesterhelt, *Biophys. J.*, **49**, 651-662 (1986).
- 25) R. H. Lozier, R. A. Bogomolni and W. Stoeckenius, *Biophys. J.*, **15**, 955-962 (1975).
- 26) T. Iwasa, F. Tokunaga and T. Yoshizawa, *Biophys. Struct. Mech.*, **6**, 253-270 (1980).
- 27) Y. Shichita, S. Matuoka, Y. Hidaka and T. Yoshizawa, *Biochim. Biophys. Acta*, **723**, 240-246 (1983).
- 28) D. Oesterhelt and B. Hess, *Eur. J. Biochem.*, **37**, 316-326 (1973).
- 29) S. O. Smith, J. A. Pardo, P. P. J. Mulder, B. Curry, J. Lugtenburg and R. Mathies, *Biochemistry*, **22**, 6141-6148 (1983).
- 30) T. Kouyama, A. Kouyama, A. Ikegami, M. K. Mathew and W. Stoeckenius, *Biochemistry*, **27**, 5855-5863 (1988).
- 31) S. P. A. Fodor, J. B. Ames, R. Gebhard, E. M. M. van den Berg, W. Stoeckenius, J. Lugtenburg and R. A. Mathies, *Biochemistry*, **27**, 7097-7101 (1988).
- 32) H. -T. Richter, L. S. Brown, R. Needleman and J. K. Lanyi, *Biochemistry*, **35**, 4054-4062 (1996).
- 33) S. P. Balashov, R. Govindjee, E. S. Imasheva, S. Misra, T. G. Ebrey, Y. Feng, R.

- K. Crouch and D. R. Menick, *Biochemistry*, **34**, 8820-8834 (1995).
- 34) A. K. Dioumaev, H. -T. Richter, L. S. Brown, M. Tanio, S. Tuji, H. Saito, Y. Kimura and J. K. Lanyi, *Biochemistry*, **36**, 8671-8676 (1998).
- 35) M. Kataoka, H. Kamikubo, F. Tokunaga, L. S. Brown, Y. Yamazaki, A. Maeda, M. Sheves, R. Needleman and J. K. Lanyi, *J. Mol. Biol.*, **243**, 621-638 (1994).
- 36) H. Kamikubo, M. Kataoka, G. Varo, T. Oka, F. Tokunaga, R. Needleman and J. K. Lanyi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1386-1390 (1996).
- 37) Y. Kiumura, A. Ikegami and W. Stoeckenius, *Photochem. Photobiol.*, **40**, 641-646 (1984).
- 38) C.-H. Chang, J. -G. Chen, R. Govindjee and T. Ebrey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 396-400 (1985).
- 39) R. Jonas, Y. Koutalos and T. G. Ebrey, *Photochem. Photobiol.*, **52**, 1163-1177 (1990).
- 40) Y. N. Zhang, L. L. Sweetman, E. S. Awad and M. A. El-Sayed, *Biophys. J.*, **61**, 1201-1206 (1992).
- 41) S. Tuji, H. Konishi, S. Inoue, S. Yamaguchi, M. Tanio, R. Needleman, J. K. Lanyi and H. Saito, 8th International Conference on Retinal Proteins, 1P-04 (1998).
- 42) C. Sanz, T. Lazarova, F. Sepulcre, E. Querol and E. Padros, 8th International Conference on Retinal Proteins, 1P-26 (1998).
- 43) A. Matsuno-Yagi and Y. Mukohata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 237-243 (1977).
- 44) E. V. Lindley and R. E. MacDonald, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 491-499 (1979).
- 45) R. E. MacDonald, R. V. Greene, R. D. Clark and E. V. Lindley, *J. Biol. Chem.*, **254**, 11831-11838 (1979).
- 46) B. Schobert and J. K. Lanyi, *J. Biol. Chem.*, **257**, 10306-10313 (1982).
- 47) D. Oesterhelt, P. Hegemann, P. Tavan and J. Tittor, *EMBO J.*, **4**, 2351-2356 (1985).

- 48) J. K. Lanyi and V. Vodyanoy, *Biochemistry*, **25**, 1465-1470 (1986).
- 49) E. Bamberg, J. Tittor and D. Oesterhelt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 639-643 (1993).
- 50) G. Varo, L. S. Brown, R. Needleman and J. K. Lanyi, *Biochemistry*, **35**, 6604-6611 (1996).
- 51) D. Oesterhelt, *Israel J. Chem.*, **35**, 475-494 (1995).
- 52) E. Bamberg, N. A. Dencher, A. Fahr and M. P. Heyn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7502-7506 (1981).
- 53) D. Braun, N. A. Dencher, A. Fahr, M. Lindau and M. P. Heyn, *Biophys. J.*, **53**, 617-621 (1988).
- 54) S. -B. Hwang, J. I. Korenbrot and W. Stoeckenius, *J. Membr. Biol.*, **36**, 137-158 (1977).
- 55) J. Schildkraut and A. Lewis, *Thin Solid Films*, **134**, 13-26 (1985).
- 56) T. Furuno, K. Takimoto, T. Kouyama, A. Ikegami and H. Sasabe, *Thin Solid Films*, **160**, 145-151 (1988).
- 57) T. Miyasaka, Y. Maekawa and K. Koyama, *Thin Solid Films*, **180**, 73-83 (1989).
- 58) T. Miyasaka and K. Koyama, *Chem. Lett.*, 1645-1648 (1991).
- 59) K. Nagy, *Biochem. Biophys. Chem. Commun.*, **85**, 383-390 (1978).
- 60) G. Varo and L. Keszthelyi, *Biophys. J.*, **43**, 47-51 (1983).
- 61) G. I. Groma, G. Szabo and G. Varo, *Nature*, **308**, 557-558 (1984).
- 62) A. A. Kononenko, E. P. Lukashev, A. V. Maximychev, S. K. Chamorovsky, A. B. Lubin, S. F. Timashev and L. N. Chekulaeva, *Biochim. Biophys. Acta*, **850**, 162-169 (1986).
- 63) K. A. Fisher, K. Yanagimoto and W. Stoeckenius, *J. Cell. Biol.*, **77**, 611-621 (1978).
- 64) T. Kouyama, Y. Kimura, K. Kinoshita Jr. and A. Ikegami, *J. Mol. Biol.*, **153**, 337-359 (1981).

- 65) K. A. Fisher, *Methods Enzymol.*, **88**, 230-235 (1982).
- 66) J. Otomo, A. Tomioka, K. Kinoshita, Jr., H. Miyata, Y. Takenaka, T. Kouyama and A. Ikegami, *Biophys. J.*, **54**, 57-64 (1988).
- 67) S. Y. Liu and T. G. Ebrey, *Biophys. J.*, **54**, 321-329 (1988).
- 68) S. Y. Liu, *Biophys. J.*, **57**, 943-950 (1990).
- 69) S. Misra, *Biophys. J.*, **75**, 382-388 (1998).
- 70) K. Koyama, N. Yamaguchi and T. Miyasaka, *Science*, **265**, 762-765 (1994).
- 71) K. Tanaka, M. Hikuma, L. Soo-Mi, Y. Iwasaki, E. Tamiya and I. Karube, *J. Biotech.*, **10**, 127-134 (1989).
- 72) H. -W. Trissl, *Biochim. Biophys. Acta*, **806**, 124-135 (1985).
- 73) S. Y. Liu, T. G. Ebrey, J. Zingoni, R. Crouch, J. -M. Fang and K. Nakanishi, *Biophys. J.*, **51**, 134a (1987).
- 74) L. Keszthelyi and P. Ormos, *Biophys. Chem.*, **18**, 397-405 (1983).
- 75) P. Ormos, S. Hristova and L. Keszthelyi, *Biochim. Biophys. Acta*, **809**, 181-186 (1985).
- 76) T. Miyasaka, K. Koyama and I. Itoh, *Science*, **255**, 342-344 (1992).
- 77) T. Miyasaka and K. Koyama, *Appl. Opt.*, **32**, 6371-6379 (1993).
- 78) N. Yamaguchi, Y. Jinbo, M. Arai and K. Koyama, *FEBS Lett.*, **324**, 287-292 (1993).

第2章

バクテリオロドプシン固定化電極の 光電流応答の発生機構

2.1. 金電極表面の酸化被膜と光電流応答

2.1.1. 緒言

従来、バクテリオロドプシン (bR) の光電流応答に関する研究では、bRを固定する電極として酸化スズ (SnO_2) 電極やITO (酸化インジウム・スズ) 電極が主に使用されてきた。これらの電極は、光を透過させることができ、また化学的安定性に優れているため、光電気化学を始めとする多くの電気化学測定に用いられてきた。これらの酸化物電極は表面水酸基のプロトン解離平衡のため、電解質溶液のpH変化と表面電位 (平衡電位) は準ネルンストの関係を示す^{1a)}。そのため、電解質溶液のpH変化によって表面電位のシフトが起こり、pH変化に応答する。

bRは光吸収によってプロトンの放出・取り込みを行う。したがって、光照射を行ったときに放出される、または取り込まれるプロトンによって電極近傍のpHが変化し、発生する光電流はこの変化に対する酸化物電極の応答である可能性が考えられる。

そこで、電位を制御することにより電極表面の酸化被膜量を厳密に制御できる金を電極として用い、pH変化に応答する酸化被膜量を変化させることで光電流応答への影響を調べた。金電極は酸素過電圧が大きく二重層域も広いため、素性が高い電極と認識されている²⁾。

Fig. 2-1-1に金電極のサイクリックボルタモグラムを示す。 $+0.7 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ 付近から本格的に酸化被膜が形成され始め、 $+1.05 \text{ V}$ にピークを持つ。形成された酸化被膜の還元は $+0.5 \text{ V}$ 付近をピークとする還元波として観測される。この還元波の面積から酸化被膜形成に要した電気量を求めることが出来る (Fig. 2-1-2にその一例を示す)。光電流測定後に測定電位からカソード方向に電位を掃引することにより酸化被膜形成に要した電気量を定量し、bRの光電流応答と関係を検討した。

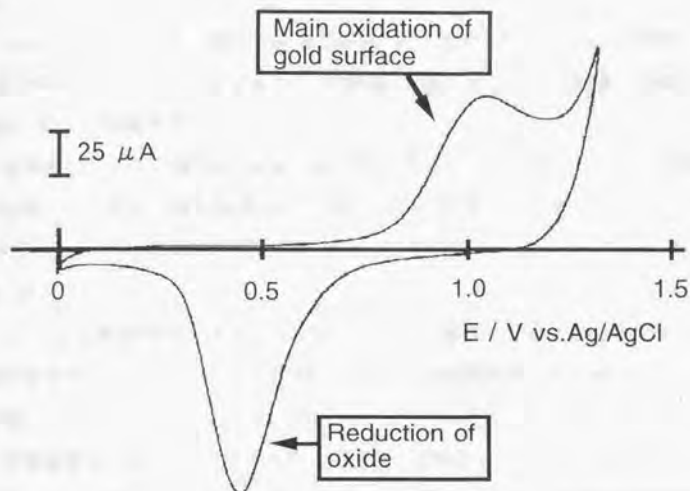


Fig. 2-1-1 Cyclic voltamogram of a gold electrode.

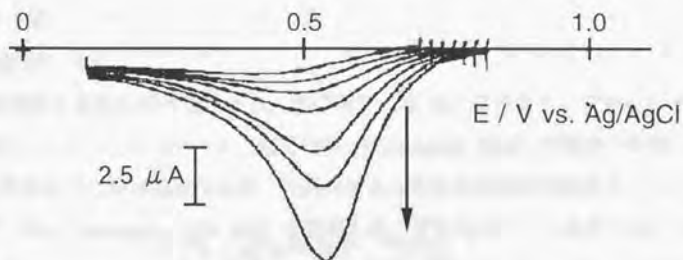


Fig. 2-1-2 Typical cathodic reduction curves recorded after photocurrent measurement at different potentials (0.70 V, 0.72 V, 0.74 V, 0.76 V, 0.78 V, 0.80 V, 0.82 V vs. Ag/AgCl). Sweep rate, 10 mV/s.

2.1.2. 実験方法

H. salinarum の培養と紫膜の精製は常法¹⁾にしたがった (Appendix参照)。得られた紫膜を568 nmでの吸光度が1 (光路長1 mm) になるよう純水に懸濁させ、使用するまで冷蔵保存した。

金電極 (ニラコ、純度99.95%) は、熱メタノールで洗浄した後、熱濃硝酸で処理し、純水で丁寧に洗浄した。また、 SnO_2 電極 (日本板硝子、 SnO_2 厚さ4500 Å) は、熱メタノールで洗浄した後、熱濃硫酸で処理し、純水で丁寧に洗浄した。

50 μL の紫膜懸濁液を電極上 1×1 cmに広げ、室温で乾燥させて固定化した。電解質溶液には0.1 Mの Na_2SO_4 を含む10 mMリン酸緩衝液 (ヤトロン、 $\text{pH}=7.2$) を用いた。

光電流測定系をFig. 2-1-3に示す。光源として500 Wキセノンランプ (ウシオ電機、UXL-500D-O) を使い、水フィルター (長さ18 cm) で赤外線を除去した。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、O-56 (オレンジ光、金電極を用いた場合) またはG-55S (緑色光、 SnO_2 電極を用いた場合)) 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。光強度の測定にはパワーメーター (アンリツ、MA9411A) を用いた。

bR固定化電極を作用電極とし、参照電極に銀/塩化銀電極を、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、各電位で15分間電位印加後、光照射によって発生する光電流をオシロスコープ (Sony Tektronix、TDS 340) で記録した。作用スペクトル測定では、ノイズを低減させるためにローパスフィルター (NF回路設計ブロック、E-3201B) を用いた。各測定電位で15分間電位印加を行ったあと、光電流を5回測定し、その平均値をその電位での光電流値とした。

金電極を用いた測定の場合は、各電位での測定後にその電位から+0.1 V vs.

Ag/AgClまで10 mV/sで電位を掃引し、発生する酸化被膜の還元波をX-Yレコーダー（横河電機、Model 3025）に記録した（還元波の波形の例はFig. 2-1-2を参照）。そして、その面積から電極上の酸化被膜形成に要した電気量の定量を行った。+0.1 Vで5分間電位を保持し、電極上の酸化被膜を完全に除去した後、次の測定電位を印加した。

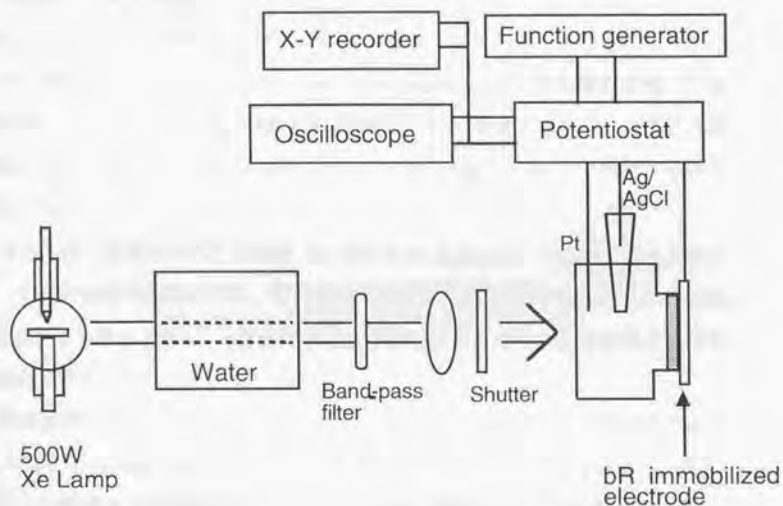


Fig. 2-1-3 Photocurrent measurement setup for bR-immobilized electrode.

2.1.3. 結果

光電流応答パターン

Fig. 2-1-4に各電位でのbR固定化金電極からの典型的な光電流応答パターンを示す。測定を行ったどの電位においても、光照射の瞬間にはカソード方向に一過性の光電流が、光照射をやめた瞬間にはアノード方向に一過性の光電流が観測された。bRが固定されていない電極では、このような一過性の応答は観測できなかった。

光電流の大きさは電位によって大きく異なった。酸化被膜が存在しない電位 (Fig. 2-1-4A) では光電流の大きさは小さくほぼ一定であり、最大となるときの1/3~1/4程度であった。金電極では+0.7 V vs. Ag/AgCl 付近から酸化被膜の形成が始まるが (Fig. 2-1-1: 金電極のCVを参照)、その形成に対応するように光電流の大きさは増加し (Fig. 2-1-4B)、+0.9 V付近 (Fig. 2-1-4C) で飽和する傾向がみられた。

また、酸化被膜が存在する電位 ($> +0.7$ V vs. Ag/AgCl) では非常に小さいアノード定常電流が観測された。これはbRが存在しない場合でも観測され、過去の報告⁹⁾ にもあるように、n型半導体として振る舞うことによる金電極上の酸化被膜の光応答である。

酸化被膜が存在しない電位 (+0.1 V vs. Ag/AgCl) と酸化被膜が存在する電位 (+0.8 V vs. Ag/AgCl) における光電流の作用スペクトルをFig. 2-1-5に示す。どちらの場合も光電流の作用スペクトルはbRの吸収スペクトルとほぼ一致し、観測されている一過性の光電流応答が酸化被膜の有無にかかわらずbRに由来することが示された。観測している光電流応答がbRに由来することは、bRが電極上に存在しない場合では一過性の光電流がまったく観測されないことから裏づけられる。

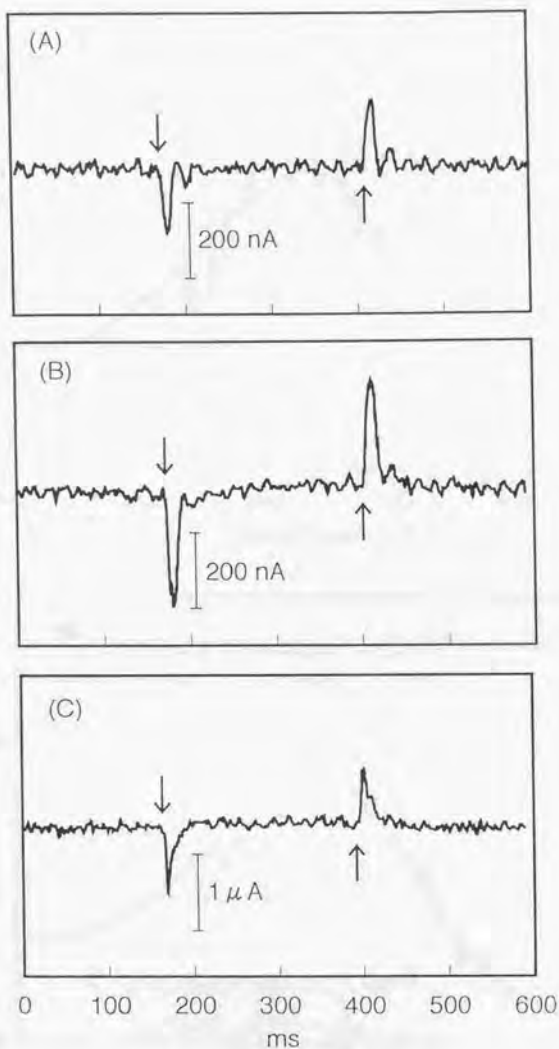


Fig. 2-1-4 Photocurrent response patterns for bR on a gold electrode at three potentials. (A) +0.1 V, (B) +0.75 V, (C) +0.90 V vs. Ag/AgCl. The arrow denote turning on and off of the incident light. Light intensity, 40 mW cm^{-2} . Electrolyte, 0.1 M Na_2SO_4 in 10 mM phosphate buffer of pH 7.2.

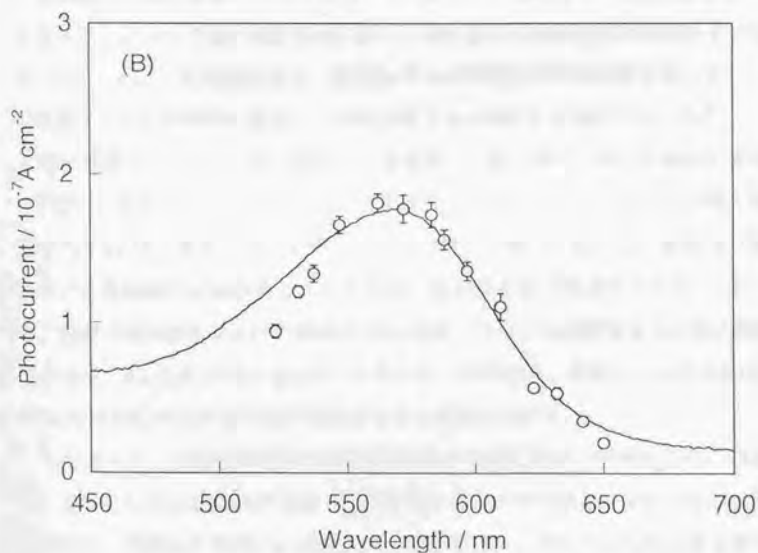
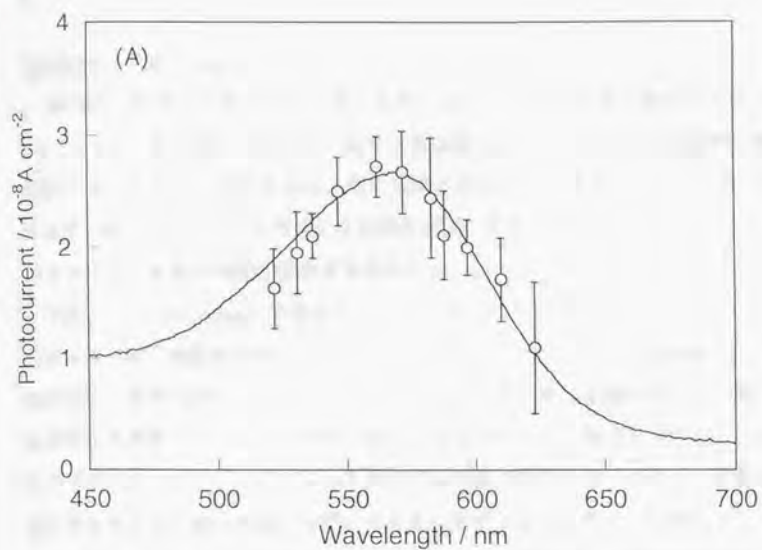


Fig. 2-1-4 Action spectra for the peak photocurrent from bR on a gold electrode. (A) +0.10, (B) +0.80 V vs. Ag/AgCl. Incident monochromatic photon flux, $1.19 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. The solid curve represents the absorption spectrum of bR in suspension.

酸化被膜と光電流応答

光照射の瞬間の光電流強度と酸化被膜形成に要する電気量の電位依存性を Fig. 2-1-6 に示す。酸化被膜形成に要する電気量は +0.7 V あたりから本格的に観測されはじめる。光電流強度は、酸化被膜の存在しない電位 (0 ~ +0.7 V) ではほぼ一定であり、+0.7 V 付近からの酸化被膜の形成に対応して増加しはじめ、+0.9 V 付近で光電流強度は飽和する傾向がみられた。なお、ポテンシャルステップ法 (0 → +1 mV step) で発生する一過性電流の電位依存性を調べたところ +0.9 V でも酸化被膜が存在しない場合の 1.5 倍程度であり、この光電流強度の増加が電気二重層容量の変化では説明できない。また、酸化被膜が存在する場合は単純な充電電流の他に酸化被膜の還元によるファラデー電流が含まれているためポテンシャルステップによって発生する電流が大きくなっており、充電電流のみを考えると酸化被膜の有無による差はあまりないと考えられる。

金電極上に酸化被膜が存在する +0.7 V ~ +0.9 V の電位域で、印加電位を細かく振ることによって酸化被膜形成に要した電気量と光電流強度との関係を求めた (Fig. 2-1-7)。光電流強度は、約 $300 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ 程度まで酸化被膜形成に要した電気量とともに直線的に増加し、それを越えると飽和する傾向がみられた。

酸化被膜形成に要した電気量から、金電極上の酸化被膜の厚みを過去の報告⁹⁾に従い以下のように見積もった。まず最初に、電極表面に形成された酸化物をすべて Au_2O_3 と仮定した。実際には、光学特性や還元挙動などの結果から酸化物にも数種類の状態があることや水酸化物の存在が示唆されている⁹⁾。そして、電極の実面積を見かけの面積の 2 倍と仮定し^{6,8)} (この見積もりも非常に困難である⁸⁾)、 Au_2O_3 の密度 $11 \text{ g}/\text{cm}^3$ ⁹⁾ を用いた。その結果、目安として約 $300\text{--}400 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ で酸化物の単原子層が形成されると見積もられた。

したがって、光電流強度は pH 変化に応答する酸化被膜の形成とともに増加し、目安としては酸化物の単原子層が形成するあたりで飽和するといえる。このように、光電流が電極の pH 変化に対する応答感度の増加とともに大きくなることから、光電流応答が電極近傍の pH 変化に由来することが示された。

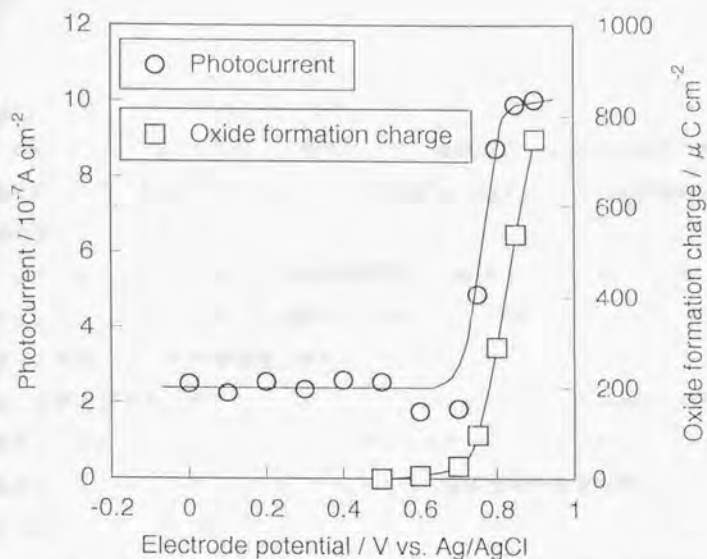


Fig. 2-1-6 Dependencies of the photocurrent density from bR on a gold electrode and the oxide formation charge on the electrode potential.

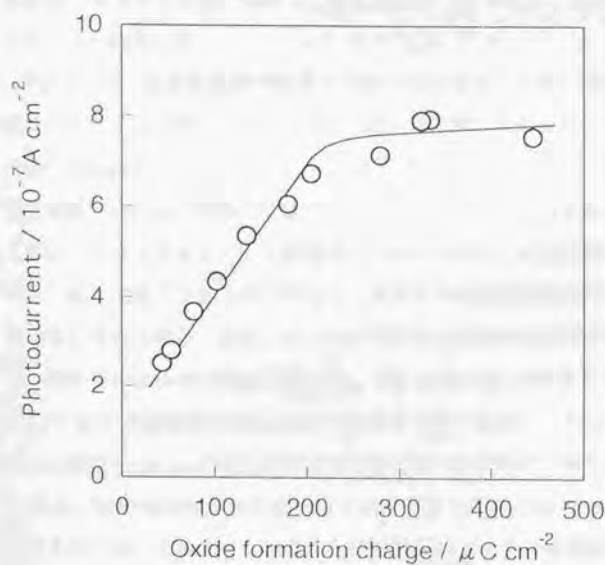


Fig. 2-1-7 Photocurrent density as a function of the oxide formation charge on gold electrodes.

バクテリオロドプシンの変性の可能性

Fig. 2-1-7で光電流が飽和する原因として、高電位でのbRの不可逆的な酸化変性の可能性が考えられる。そこで、光電流応答と吸収スペクトルの観点から、bRの変性について検討した。

まず、bRが固定化されたときの吸着変性の可能性を、bRをキャスト法で固定化した石英の吸収スペクトル測定から検討した。通常、タンパク質は固体界面への吸着によって立体構造の変化を引き起こし変性してしまう可能性があり、注意を要する。チトクロームcなどの電子伝達タンパク質も電極に直接吸着することによって変性し、電極への電子伝達を行うことができないことも報告され、スムーズな電子伝達を行わせるために電極表面の化学修飾などの工夫も行われている¹⁰⁾。

石英はSnO₂コートガラスと同様に熱メタノールで洗浄した後、熱濃硫酸で処理し、純水で丁寧に洗浄した。その石英にbR（光路長1 cmで吸収極大での吸光度が1.0）をキャスト法で固定し、分光光度計（日本分光、Ubest 50）で吸収スペクトルを測定した。

Fig. 2-1-8にbR固定化膜の吸収スペクトルを示す。石英に固定化したbRの吸収スペクトルは溶液中での吸収スペクトルとはほぼ同じであった。bR固定化膜のレチナールに由来する吸収極大波長は560-562 nmであり、溶液中の明順応bR（明順応状態で568 nm、暗順応状態で558 nm）に比べて若干短波長側にシフトした。これは、ポリカチオンによる静電相互作用を利用したbR固定化でも報告されており、bRの変性によるものではなく、周囲の環境変化に由来する誘電率の変化によると考えられる。また、タンパク質部分に由来する吸収は278-283 nmであり、溶液中のbRとほぼ同じであった。562 nmと280 nmの吸光度の比、 A_{562}/A_{280} は1.7でありbR懸濁液の値2.0よりやや小さくなったが、これは懸濁液では散乱による影響で280 nmの吸光度が大きくなっているためだと考えられる。

また、時間分解赤外分光法などでは本論文と同様にbRをフィルム状にして測定を行うが、このような状態でもbRが光反応サイクルを通常通り行うことが

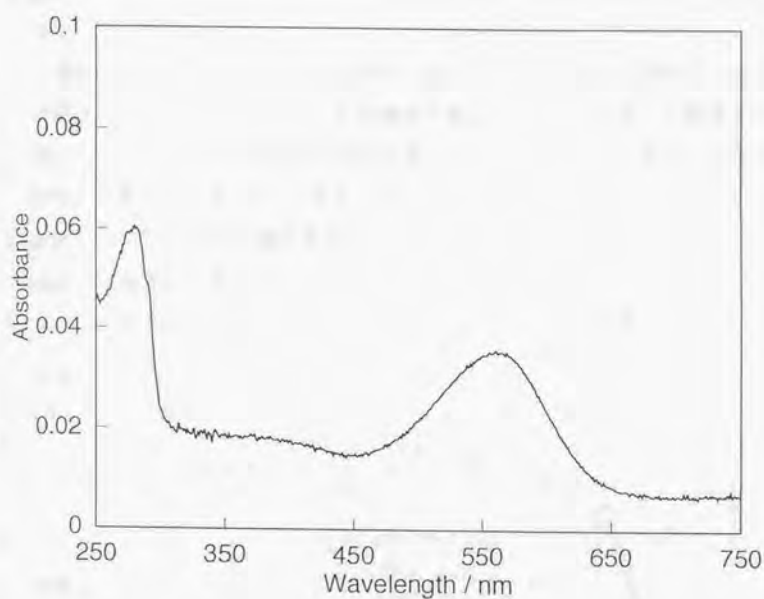


Fig. 2-1-8 Absorption spectrum of bR-immobilized quartz plate.

Table 2-1-1 Absorption spectra data of bR-immobilized quartz plates (n=5).

Wavelength	Absorbance
560-562 nm	0.027 ± 0.006
278-283 nm	0.046 ± 0.012

$$A_{280} / A_{560} = 1.7 \pm 0.069$$

確かめられている。これらのことから、固定化したことによるbRの変性は起こっていないと結論づけた。

電位を印加することによるbRの変性を調べるため、各電位印加後に+0.1 Vまで電位を掃引したあと、+0.1 Vで光電流を測定し、電位印加前の光電流との比較を行った。その結果をFig. 2-1-9に示す。+0.8 V程度までは、電位印加前と印加後の光電流の比は 1 ± 0.1 であり、電位印加による応答の減少はないと考えられた。すなわち、bRの酸化変性も起きていないと考えられる。それに対して+0.8 Vを越えると電位印加前と印加後の光電流の比は減少する傾向がみられた。この減少はbRの不可逆的な酸化変性に由来することが推測される。

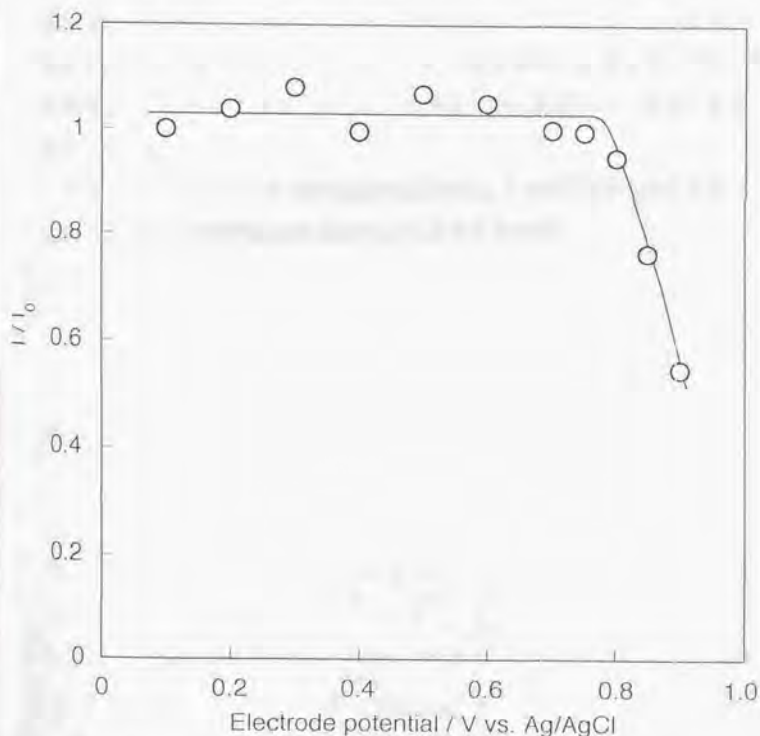


Fig. 2-1-9 Ratio of the photocurrent density at +0.1 V after a potential journey to a positive potential on the abscissa (I) to that before the potential journey (I_0).

bRを固定した SnO_2 電極からの光電流応答

Fig. 2-1-10にbRを固定した SnO_2 電極からの光電流応答パターンを示す。光電流の立ち上がりは4 ms程度、減衰は5 ms程度であり、金電極で酸化被膜が存在する場合と同様の応答パターンが得られた。光電流の振幅は、金電極で飽和するときとほぼ同様の大きさであった。

bRを固定した SnO_2 電極からの光電流の電位依存性をFig. 2-1-11に示す。0 Vから0.8 V程度までは光電流の大きさはほぼ一定であった。0.7 V以上での挙動は明らかに金電極を用いた場合と異なることがわかる。すなわち、金を用いた場合は0.7 V付近から急激に光電流強度が増加したのに対し、 SnO_2 電極を用いた場合は0.7 V付近で光電流強度に大きな変化はみられなかった。この結果は、金電極を使用した場合の+0.7 Vあたりからの光電流強度の急激な増加が単に電位を印加したことによる効果ではなく、金電極の酸化被膜形成の影響であることを示している。

また、0.8 V以上での光電流強度の低下はFig. 2-1-9でも見られたとおり、高電位でのbRの不可逆的な酸化変性によると考えられる。

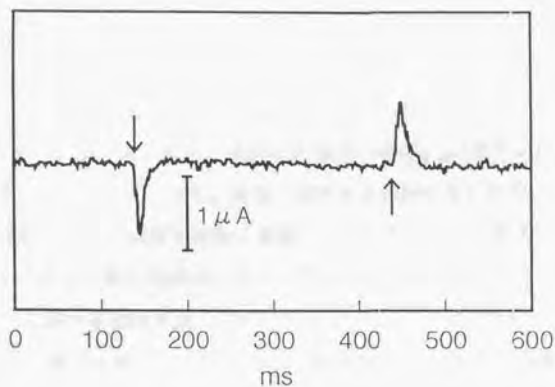


Fig. 2-1-10 Photocurrent response pattern for bR on an SnO_2 electrode at 0.0 V vs. Ag/AgCl. The arrows denote turning on and off of light.

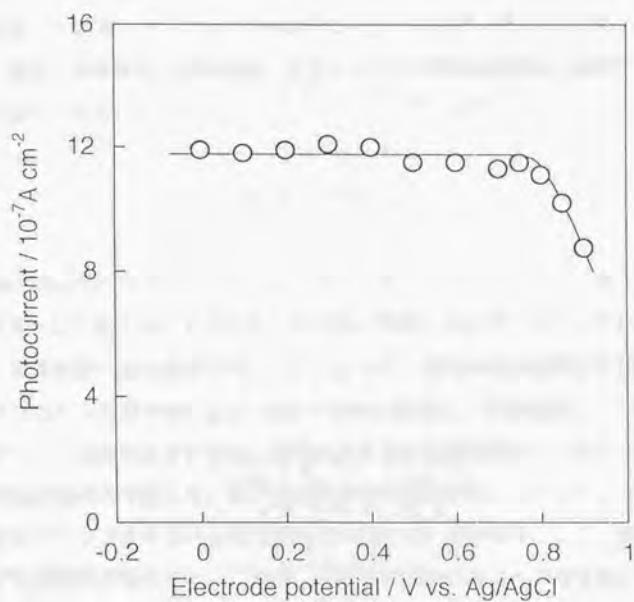


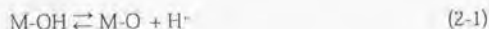
Fig. 2-1-11 Potential dependence of the photocurrent density from bR on an SnO_2 electrode.

2.1.4. 考察

酸化物電極からの光電流発生メカニズム

電極-溶液界面のbRから発生する一過性の光電流応答は、pH変化に応答する酸化被膜の形成とともに大きくなり、最後に飽和する傾向が見られた。0.7 V以上での光電流強度の増大はbR固定化SnO₂電極ではみられず、この結果は単なる電位印加の効果ではなく酸化被膜が形成されたことによる効果であることがわかる。pH変化に応答する酸化被膜の形成とともに増加するbRの光電流応答は、bR分子のプロトン放出・取り込みに依存した電極近傍のpH変化に由来すると解釈できる。

得られた結果をもとに、酸化物電極に固定化されたbRからの光電流発生メカニズムをFig. 2-1-12に提案した。酸化物半導体電極を溶液に接した状態にすると、電極内部のうち溶液に非常に近い部分で空間電荷層が形成される。電極表面の水酸基では式(2-1)のようなプロトン解離平衡が成り立っているため、電極の表面電位（平衡電位、フラットバンド電位と同義）は溶液のpHによって定められる。



bRの光反応サイクルでは、(pHが中性の場合には) プロトンの放出が取り込みに先んじて起こる。そのため、光照射の瞬間にはまずプロトンの放出が起こり、電極近傍のpHは低下する。これによって、酸化物電極表面に存在する水酸基のプロトン解離平衡(2-1)は左の方向に移動し、その結果として表面電位はアノード方向にシフトする。本論文のような定電位測定では電位のシフトは空間電荷層のみで起こり、バンドの曲がり方が変化する。これはカソード方向へ電位をステップさせるのと同じ効果を持つため、その結果として一過性のカソード充電電流が発生する。これが、光照射の瞬間のカソード光電流に対応すると考えられる。その後、プロトンの放出と取り込みが釣り合う一種の光定常状

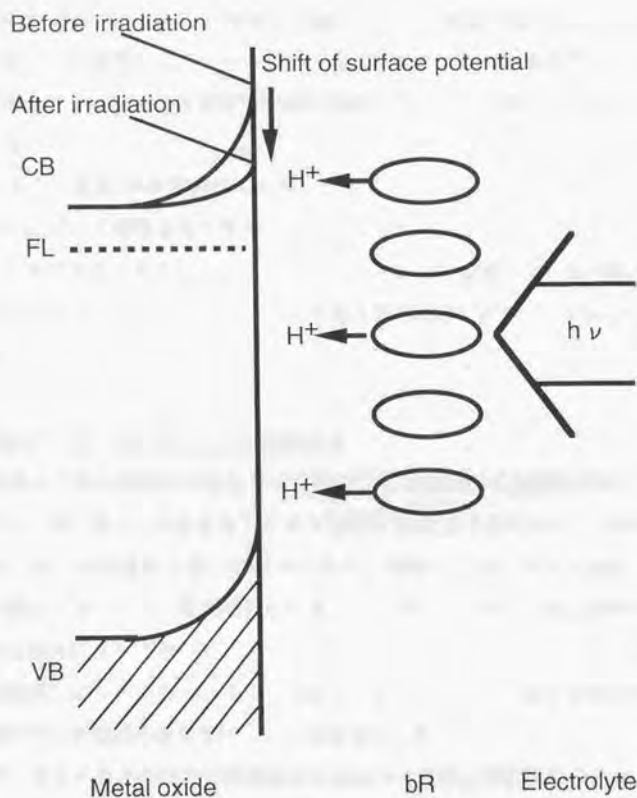


Fig. 2-1-12 Mechanism of the transient photocurrent generation from bR on an oxide-covered metal electrode. CB, VB, and FL denote the conduction band, valence band, and Fermi level, respectively.

態になると考えられ、そのため光照射の間は電流が流れない。光照射終了の瞬間では、最後にプロトンの取り込みが起こるため電極近傍のpHは一時的に上昇する。これによって光照射の瞬間とは逆にプロトン解離平衡(2-1)は右の方向に移動し、表面電位はカソード方向へのシフトにより一過性のアノード充電電流が発生する。これが光照射をやめた瞬間のアノード光電流に対応すると考えられる。

このように電極-溶液界面のbRの微分型光電流応答は、bRのプロトン放出・取り込みに対して電極表面水酸基のプロトン解離平衡が一時的に変化することによって発生すると考察した。したがって、本論文で観測している光電流応答は、bR分子内部の電荷移動に由来する光電応答と明確に区別しなければならないと考えられる。

酸化被膜が存在しない電位での光電流応答

金電極上に酸化被膜が存在しない状態では、電極表面に水酸基は存在せず、したがって式(2-1)のようなプロトン解離平衡は成り立たない。そのため、pH変化に対する応答性も弱いと考えられる。実際に、pHに対する感度の低下から予想されるとおり、酸化被膜が存在しない電位の光電流応答は酸化被膜が存在する場合に比べて著しく小さくなっている。しかし、上で述べたメカニズムでは説明しにくい応答であることは確かである。そこで、酸化被膜が存在しない電位での光電流応答発生について考察を行った。

まず、考えられるのは電解質溶液の不純物が金電極に吸着することによってpH応答性を持つことである。そこで、支持電解質および緩衝剤として用いる塩の再結晶を厳密に行った。

支持電解質として用いている Na_2SO_4 (和光特級、純度99.0%以上)は純水から2回再結晶を行った。また、緩衝用の塩として、 KH_2SO_4 (和光特級、純度99.0%以上)を用い、純水から2回再結晶を行った。pH調整には、新品のpH滴定用1M水酸化ナトリウム水溶液(和光、容量分析用)を使用直前に開封して

用いた。

Fig. 2-1-13に市販の塩をそのまま使用した電解質溶液と再結晶を厳密に行った電解質溶液を用いた場合のbR固定化電極の光電流応答の大きさを比較した。両者の間では、光電流強度に違いはほとんど見られず、電解質溶液の不純物が酸化被膜の存在しない電位での光電流応答に寄与しているわけではないことが明らかになった。

金属電極-溶液界面には電気二重層が形成されており、コンデンサーとしての性質を持つことが知られている。電気二重層の構造に関しては未解決な問題が多いが、Sternの電気二重層モデルではHelmholtzおよびGouy-Chapmanの2つの二重層からなる¹⁴⁾。このモデルでは、2つのコンデンサーが直列に接続していると考えられる。光照射時にプロトンが放出されることにより、プロトンの正電荷による単なる電気二重層の充電が起こると推測される。

Fig. 2-1-1のようなサイクリックボルタモグラムのファラデー電流が流れない電位域 (Fig. 2-1-1では0~0.7 V vs. Ag/AgCl程度) において、電位を掃引したときに発生する充電電流 i は、電気二重層の静電容量を C 、電位掃引速度を v とすると、 $i = C v$ となる。Fig. 2-1-1を見ると明らかなように金電極では0~0.7 Vの範囲で充電電流 i は一定であり、したがって電気二重層容量も電位に依存しない。このことは、bR固定化金電極の光電流強度が0~0.7 Vでほぼ一定である (Fig. 2-1-6) と矛盾しない。

すなわち、酸化被膜が存在しない電位において発生する光電流も、bRが放出、または取り込んだプロトンの正電荷によって誘起されと考えられ、本質的には酸化被膜が存在する電位での光電流応答と同じ起源であると推測される。本節の重要なポイントは、光電流応答がbRが放出・取り込むプロトンに由来することを、電極上の酸化被膜量を厳密に制御しながら変化させプロトンに対する感度を変えることで明確に示したことである。

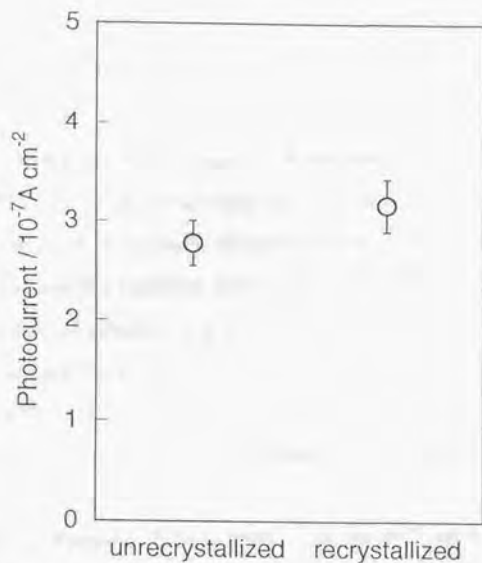


Fig. 2-1-13 Comparison of the peak photocurrent at light-on from bR on a gold electrode using unrecrystallized salts and recrystallized salts.

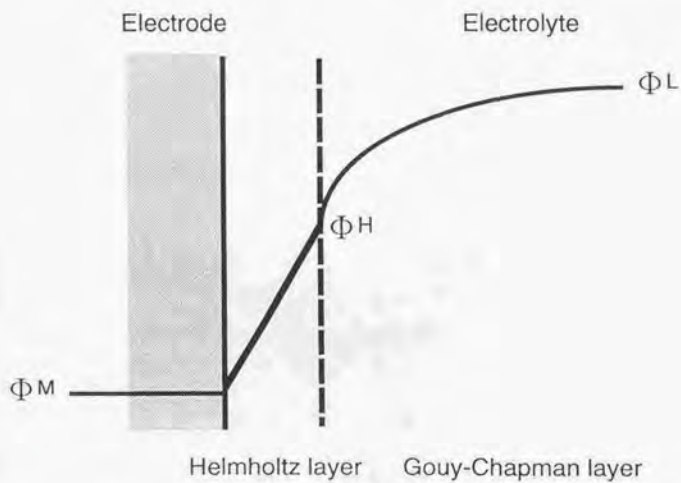


Fig. 2-1-14 Stern model of electric double layer.

参考文献

- 1) H. A. Laitinen and T. M. Hseu, *Anal. Chem.*, **51**, 1550-1552 (1979).
- 2) A. Fog and R. P. Buck, *Sensors Actuators*, **5**, 137-146 (1984).
- 3) A. J. Bard Ed: "Electroanalytical Chemistry", **9** (1976).
- 4) D. Oesterheld and W. Stoeckenius, *Methods Enzymol.*, **31**, 667-678 (1974).
- 5) T. Watanabe and H. J. Gerischer, *Electroanal. Chem.*, **117**, 185-200 (1981).
- 6) J. W. Schultz, *Electrochim. Acta*, **17**, 451-461 (1972).
- 7) T. Dickinson, A. F. Povey and P. M. A. Sherwood, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II*, **71**, 298-311 (1975).
- 8) J. O. Besenhard, R. Parsons and R. M. Reeves, *J. Electrochem. Soc.*, **96**, 57-72 (1979).
- 9) P. G. Jones, H. Rumpel, E. Schwarzmann, G. M. Sheldrick and H. Paulus, *Acta Cryst.*, **B35**, 1435-1437 (1979).
- 10) 例えば谷口 功, 電気化学, **56**, 158-162 (1988).
- 11) 喜多 英明, 魚崎 浩平, 電気化学の基礎, Chap. 8 (1983).

2.2. 電解質溶液の緩衝能の効果

2.2.1. 緒言

前節の結果から、bR固定化電極の微分型光電流応答はbRのプロトン放出・取り込みに依存した電極近傍のpH変化に由来する可能性が示された。光電流発生が前節提案したメカニズムに従うとすると、光電流応答は電解質溶液に含まれるバッファーに大きく影響されることが推測される。

しかし、bRの光電流応答に対するバッファーの影響は、とくに前章のような発生機構を検討するうえで重要な情報を与えると考えられるにもかかわらず、詳細に調べた報告はほとんどない。また、光電流応答のpH依存性は必ずしもbRのプロトンポンプ活性のpH依存性と一致するわけではなく、問題点のひとつとなっている。過去のbRの光電流応答に関する報告でもバッファーは使用されているが、その効果については全くといっていいほど検討されていない。

本節では、bRの光電流応答に対するバッファー緩衝能の影響を詳細に検討し、その結果から光電流発生機構の考察を行った。

2.2.2. 実験方法

568 nmでの吸光度が1（光路長 1 cm）になるよう調整した紫膜懸濁液 50 μ L を、前節のように処理したSnO₂電極上 1×1 cmに広げ、室温で乾燥させて固定化した。

支持電解質として0.1 Mの硫酸ナトリウムを用い、バッファーに2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES) / NaOH、2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris) / HCl、KH₂PO₄ (Phosphate) / NaOHを用いた。電解質溶液のpHを一定に保ちながらバッファー濃度を変化させ、その影響を調べた。また、バッファー存在下でのpH依存性を調べるときは、バッファー濃度を50 mMに保って測定を行った。

光電流測定系は前節と同様であり、各条件で5回の測定を行い、その平均値を光電流値とした。

2.2.3. 結果

光電流応答パターン

バッファー濃度を変化させたときの光電流応答パターンをFig. 2-2-1に示す。電解質溶液中にバッファーが存在しない場合 (Fig. 2-2-1A) では、立ち上がりが約10 ms、減衰時間が30-40 ms程度と応答速度が遅くなる傾向がみられた。一般的な傾向として、バッファーが存在すると光電流応答の速度は早くなった。また、バッファー濃度の増加にしたがって光電流の大きさが減少する傾向が見られた (Fig. 2-2-1BとFig. 2-2-1Cを比較)。以下の項で、詳細について述べる。

光電流応答のバッファー濃度依存性

光照射時の光電流強度のバッファー濃度依存性をFig. 2-2-2に示す。光電流強度はバッファーが微量存在するとき (2-5 mM程度) に最大値を示し、それを越えると単調に小さくなった。用いた3種類のバッファーに関しては、同様の傾向がみられた。

バッファー濃度が増加すると溶液のpH変化は抑えられる。発生する光電流が前節で提案したようにbRのプロトン放出・取り込みによるpH変化に由来するとすれば、バッファー濃度の増加によってpH変化が抑えられた結果、それに対応する光電流応答も抑えられたという定性的な解釈を行うことができる。

さらに詳しくbR由来の光電流強度とバッファー濃度との関係を明らかにするため、光電流強度の逆数 ($1/I$) をバッファー濃度に対してプロットした。その結果をFig. 2-2-3に示す。バッファー濃度が10 mMから約200 mMの広い範囲で $1/I$ がバッファー濃度に正比例した。中性のpHで効く3種類のバッファーを用い、そのバッファーの pK_a 付近でバッファー濃度を変化させると、ほぼ同様の比例関係が得られた。この結果は2.2.4.で考察を行う。

バッファー濃度を10 mMと一定にして支持電解質である Na_2SO_4 濃度を変化させたときの光電流の大きさをFig. 2-2-4に示す。ここでは、 Na_2SO_4 濃度 100 mM、バッファー濃度 10 mMから Na_2SO_4 濃度を増加させており、Fig. 2-2-2で同じ条件

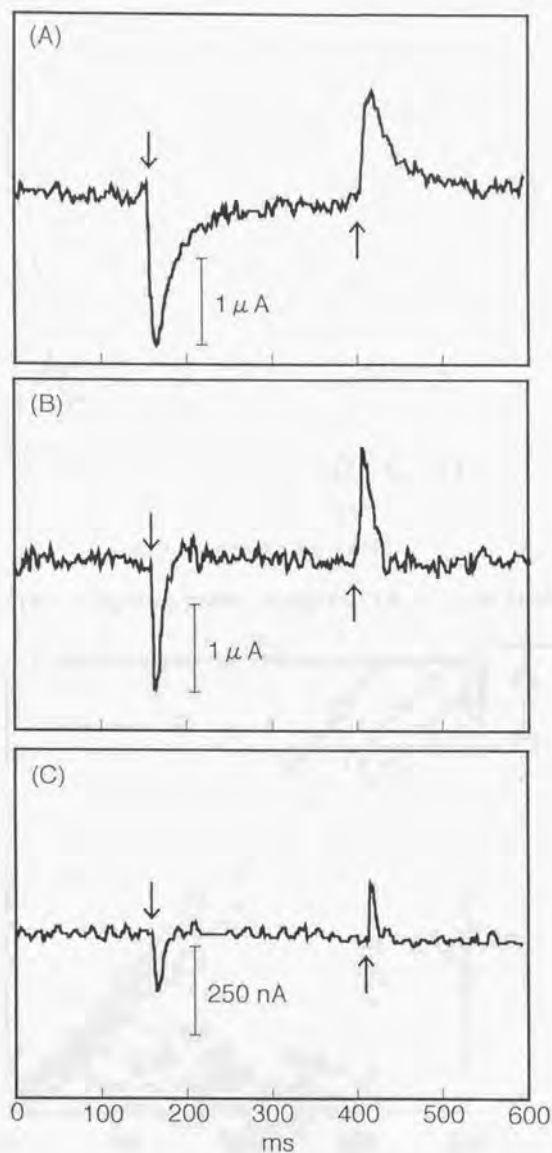


Fig. 2-2-1 Photocurrent response patterns from bR-SnO₂/electrolyte interface at different concentrations of HEPES buffer. (A) 0 mM, (B) 10 mM, (C) 50 mM. The arrows denote turning on and off of light. Light intensity, $1.2 \times 10^2 \text{ mW cm}^{-2}$. Electrolyte, 0.1 M Na₂SO₄ with HEPES buffer (pH=7.5).

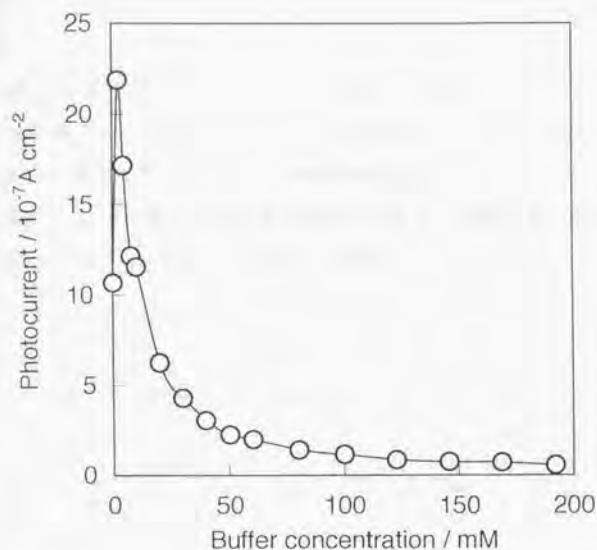


Fig. 2-2-2 Dependence of light-on photocurrent from bR-SnO₂ on HEPES concentration.

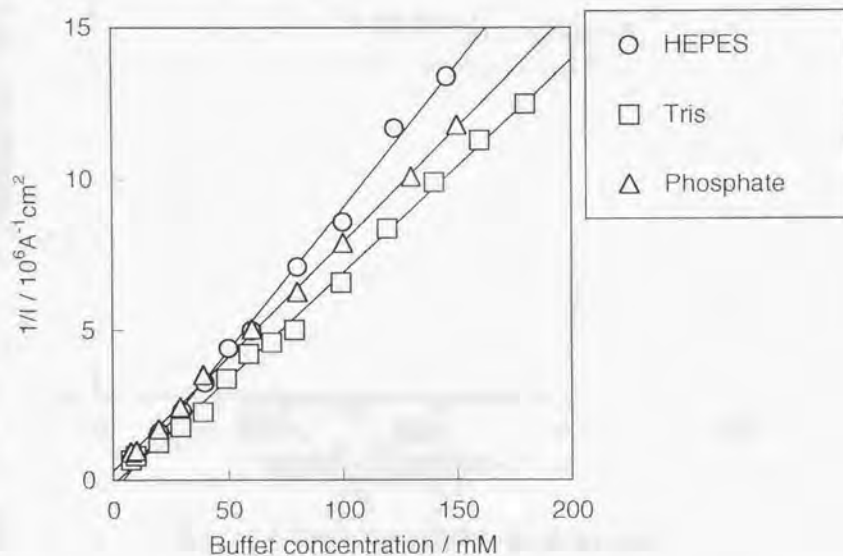


Fig. 2-2-3 Reciprocal of photocurrent intensity as a function of buffer concentration for HEPES (pH=7.5), Tris (pH=8.3) and phosphate (pH=6.9) buffers

(Na_2SO_4 濃度 100 mM、バッファー濃度 10 mM) からバッファー濃度を増加させた場合との比較である。 Na_2SO_4 濃度が 100 mM から 400 mM の範囲では、 Na_2SO_4 濃度を変化させても光電流強度はほとんど一定であった。したがって、Fig. 2-2-2 の光電流強度の減少は単なるイオン強度の増加に由来するのではなく、バッファーの効果であることは明らかである。

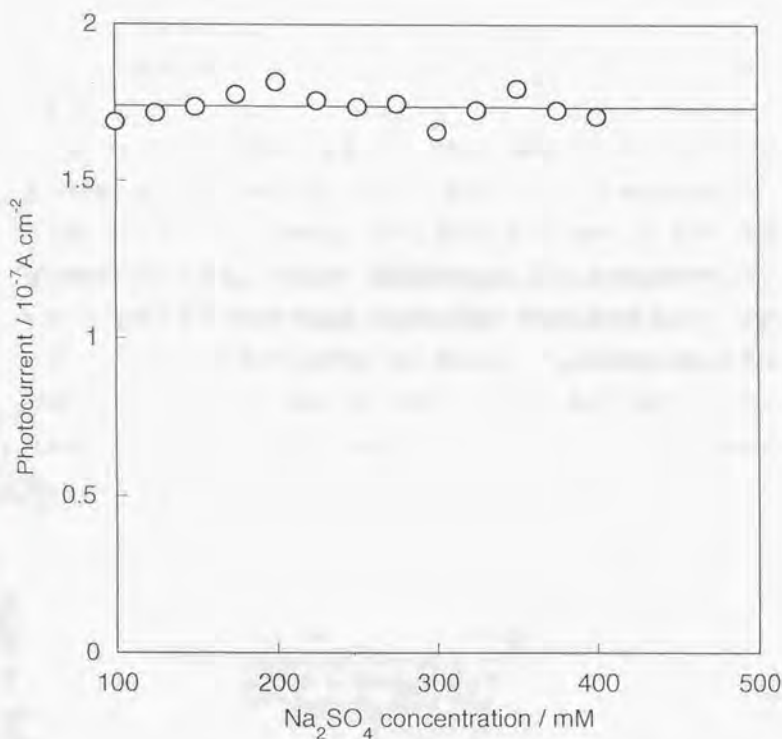


Fig. 2-2-4 Dependence of light-on photocurrent from bR-SnO₂ on Na_2SO_4 concentration.

光電流応答速度のバッファー濃度依存性

光電流応答の速度は電解質溶液中のバッファーの有無に大きく依存した。まず、光電流の立ち上がりは、バッファーが存在しない場合では約10 msとバッファーが存在する場合に比べて2〜3倍程度遅くなった。バッファーが存在すると4.5 msではほぼ一定となった。これは測定系の時定数（約4 ms）で決まる値である。

Fig. 2-2-5に光照射時に発生する光電流応答の減衰時間をバッファー濃度に対してプロットした。バッファーが存在しない場合は減衰時間は著しく遅いが、バッファー濃度の増加にしたがって減衰時間は早くなり、約20 mM以上ではほぼ一定となった。

前節で提案した光電流発生機構では、光照射の瞬間のbRからのプロトン放出が電極近傍のpHを一時的に低下させ、一過性のカソード光電流を誘起する。その後、bR分子のプロトン放出とプロトン取り込みがほぼ釣り合うため、光電流は観測されなくなる。このとき、電極近傍のpHはプロトンの拡散やバッファーなどの効果によりバルクのpH値（最初のpH値）に戻ると考えられる。このとき、バッファーが存在すれば存在しない場合に比べてpHが最初の値に戻るのが早くなる。そして、この効果はある程度のバッファー濃度で飽和すると考えられる。このpHの戻りが光電流の減衰にも関与するため、光電流応答の減衰がFig. 2-2-5のようなバッファー濃度依存性を示すと考えられる。

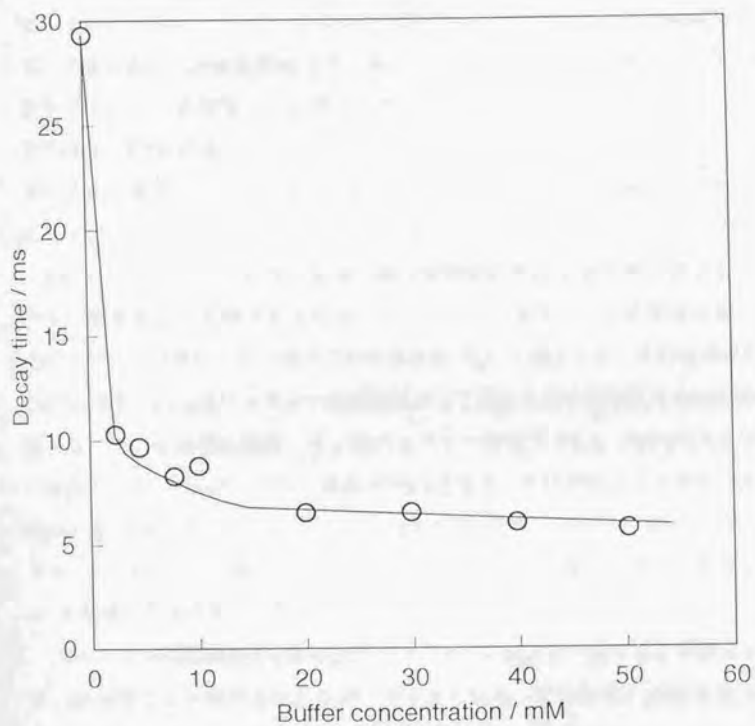


Fig. 2-2-5 Dependence of the decay time of light-on photocurrent on HEPES buffer concentration.

バッファー存在下での光電流応答のpH依存性

各バッファーが存在する場合と存在しない場合の光電流強度のpH依存性 (pH 6~9) をFig. 2-2-6に示す。バッファーが存在しないときの光電流強度のpH依存性は、過去に報告された、bRを含んだベシクルによるプロトンポンプ活性のpH依存性と類似していた。しかし、バッファーが存在するとその種類によって、光電流強度のpH依存性は大きく異なった。すなわち、リン酸バッファー存在下ではpHの上昇に従って光電流強度が大きくなり、HEPESバッファー存在下ではpH7.5付近に極小となるお椀型の挙動を示した。またTrisバッファー存在下ではpHの低下とともに光電流強度が大きくなった。これらの傾向は、明らかにバッファーの種類の影響であるといえる。

bRのプロトンポンプ活性の影響を除き光電流応答のpH依存性に対するバッファー効果をより明確にするために、バッファー存在下での光電流の値 (I) をバッファーが存在しない場合での光電流値 (I_0) で補正した。その結果をFig. 2-2-7に示す。 I/I_0 はバッファーの種類によって異なる極小値を取るお椀型の曲線となった。その極小値は、リン酸バッファー存在下で6.8、HEPESバッファー存在下で7.7、Trisバッファー存在下で8.3となり、それぞれのバッファーの実効pKa'値 (6.8 (リン酸バッファー)、7.55 (HEPESバッファー)、8.3 (Trisバッファー)、バッファー濃度50 mM、0.1 M Na_2SO_4 、20℃の場合、導出は参考文献1) を参照) とほぼ等しくなった。

バッファーの緩衝能は溶液のpHがバッファーのpKa'と一致するとき最大となり、pHがそこから離れるにしたがって小さくなる。すなわち、pH変化量は溶液のpHがバッファーのpKa'と等しい場合に最小となる。したがって、Fig. 2-2-7で示された結果は、バッファー緩衝能の増減と光電流強度が対応しており、バッファー濃度依存性と同様に緩衝能の効果に由来すると考えられる。

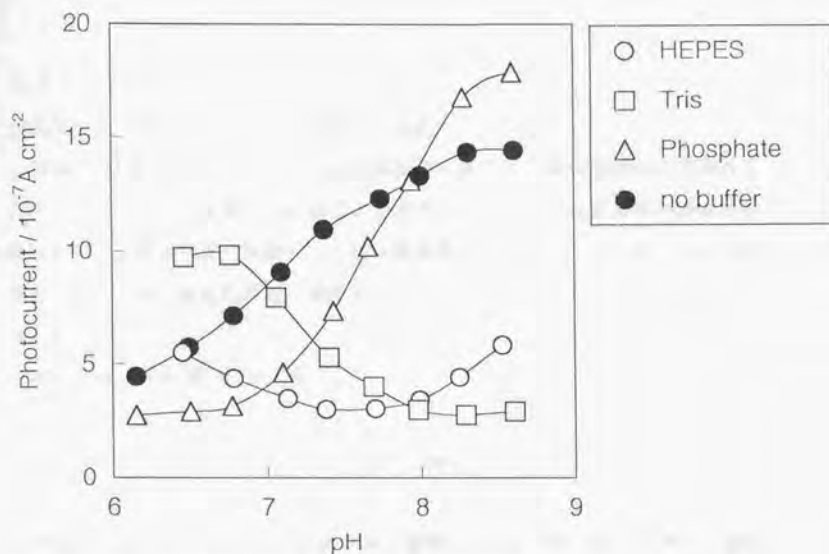


Fig. 2-2-6 pH dependence of light-on photocurrent in the presence of 50 mM HEPES, Tris, phosphate buffers and in the absence of buffer.

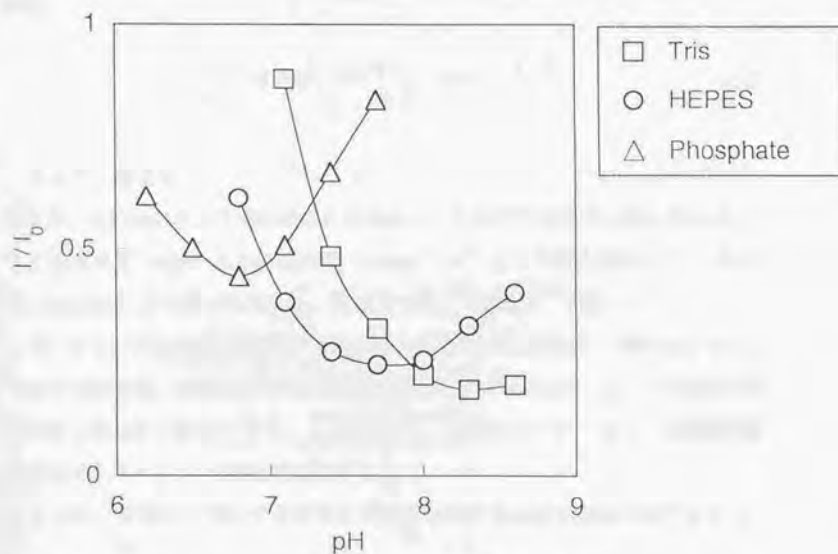


Fig. 2-2-7 pH dependence of the ratio of photocurrent in the presence (I) to that in the absence (I_0) of buffers for HEPES and Tris, phosphate.

2.2.4. 考察

光電流応答に対するバッファー緩衝能の効果

電極-溶液界面のbRから発生する光電流の大きさは、電解質溶液に含まれるバッファーに大きな影響をうけることを明らかにした。電解質溶液の緩衝能が増加すると光電流強度は減少し、これは緩衝能の増加によって溶液のpH変化が抑えられるためと考えられる。本節では、bRの光電流強度と緩衝能の関係を考察する。

$\text{HA} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{A}^-$ に基づく緩衝系のpHは

$$\text{pH} = \text{pK}_a' + \log [\text{A}^-]/[\text{HA}] \quad (2-2)$$

で与えられる。 $[\text{A}^-]$ と $[\text{HA}]$ の和が同一濃度 c であること、またカチオン濃度の和がアニオン濃度の和に等しいことを用いると、pHをある小さな値だけ増加させるのに必要な強塩基の量は次式で与えられる¹⁾ (式の導出は参考文献2)を参照)。

$$\frac{d[\text{B}]}{d\text{pH}} = 2.303 \left\{ \frac{cK_a'[\text{H}^+]}{(K_a' + [\text{H}^+])^2} + [\text{H}^+] + \frac{K_w}{[\text{H}^+]} \right\} \quad (2-3)$$

ここで、酸を加えたときは $d[\text{B}]$ が負になると考えるので、 $d[\text{B}]/d\text{pH}$ は常に正となる。 $d[\text{B}]/d\text{pH}$ という量は溶液の緩衝能力の定量的な表現で、Van Slykeによって緩衝単位 (unit) または緩衝価 (value) " β " として導入されたが²⁾、緩衝能 (capacity) とも呼ばれている。本論文では、" 緩衝能 " で統一した。

式 (2-3) で K_w は水のイオン積である。第2項と第3項は水の緩衝能を表し、それぞれ強酸性、強アルカリ性で重要となる。そのためpH3~pH11の範囲では第2項と第3項は無視できる。したがって、溶液のpHが一定ならば緩衝能 $d[\text{B}]/d\text{pH}$ はバッファー濃度 c に正比例する。

さらに、溶液中で変化する酸または塩基の変化量 $d[\text{B}]$ が常に一定であれば、

溶液のpH変化量 ΔpH とバッファー濃度 c は反比例の関係にある。bRのプロトンポンプ活性はバッファー濃度に依存しないので、光照射の瞬間または光照射を終えた瞬間に放出または取り込まれるプロトン量、その時間（タイミング）は

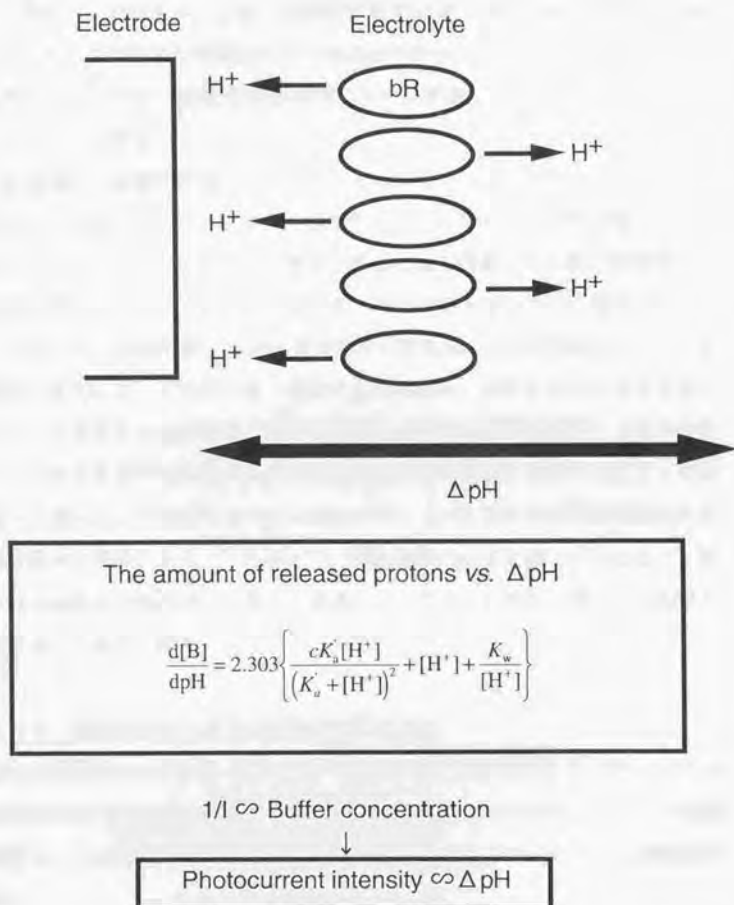


Fig. 2-2-8 Schematic illustration of relationship between photocurrent intensity and buffer capacity.

一定であると考えられる。したがって、光照射時にpH変化を引き起こすプロトン量は一定である。

以上のことから（模式図をFig. 2-2-8に示す）、光電流強度の逆数、 $1/I$ がバッファー濃度に正比例することは、光電流強度がpH変化量、 ΔpH と比例することを示す。そして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明かなように、pH変化を引き起こすのは電極に固定化されたbRが放出するプロトンである。

この結果は、前節で提案したメカニズムに（半）定量的な解釈を与えることができる。このメカニズムでは、電極近傍のpH変化による酸化物電極の表面電位のシフトが一過性の充電電流を発生させることを提案した。酸化物電極の表面電位は電解質溶液のpHに対して準ネルンスト応答をすることが報告されている。すなわち、pH変化量、 ΔpH と表面電位の変化幅、 ΔV は比例する。この表面電位の変化によって発生する一過性の充電電流は、電位をステップさせることによって発生する充電電流と同じである。そこで、電位変化幅、 ΔV とそれによって発生する一過性のカソード充電電流の関係をポテンシャルステップ法によって調べた。その結果をFig. 2-2-9に示す。 ΔV と発生する充電電流の大きさは正比例の関係にある。したがって、電極近傍のpH変化量とそれによって発生する一過性の充電電流は比例し、本節のバッファー効果から導かれる結論と一致するとともに、前節のメカニズムを裏付ける。

バッファー濃度が小さいときの光電流応答の挙動

bRの光電流の大きさは、バッファー濃度がごく小さいとき（ $< 約5 \text{ mM}$ ）には単調に減少するわけではなく、逆に増加する傾向がみられた。また、その減衰時間も、十分なバッファーが溶液中に存在するときと比べ遅くなる傾向があった。

これは、bRが放出したプロトンがバルクへ拡散する速さの違いに由来していると考えられる。Heberleらは、bRとともに存在する脂質膜が一種のバッ

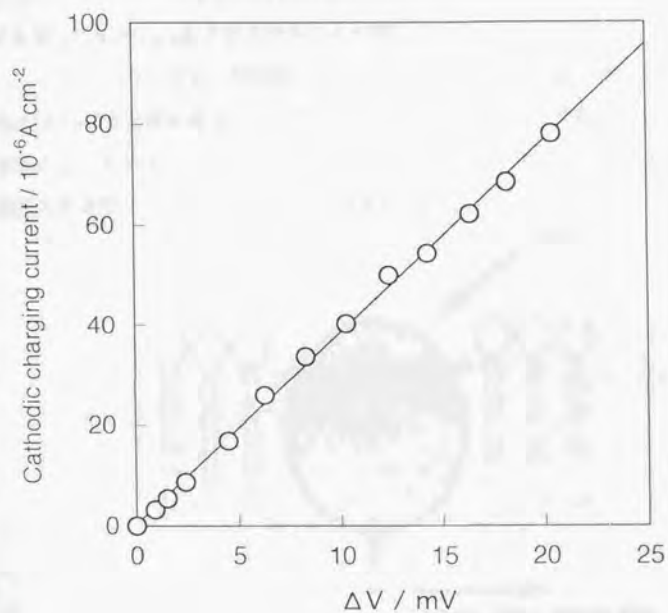


Fig. 2-2-9 The amplitude of the cathodic charging current generated by potential step.

ァーとして機能することを明らかにしている³⁾。すなわち、bRから放出されたプロトンはバルクに拡散するよりも早く膜表面に沿って拡散する (Fig. 2-2-10)。そして、溶液中に存在するバッファーが一種のキャリアーとしてバルクへのプロトン拡散を早める。バルクへのプロトン拡散の時定数は、バッファーが存在しないときには1.29 msであるのに対し、1 mMイミダゾールバッファーが存在する場合は約300 μ sまで早くなることが明らかにされている。

このため、バッファーが存在しないときにはプロトン拡散の遅れによって電極近傍のpH変化率が低下し、その結果として光電流強度が微量のバッファー存在時に比べて小さくなると考えられる。バルクへのプロトン拡散の遅れは、光電流応答速度にも影響を与えていると考えられる。

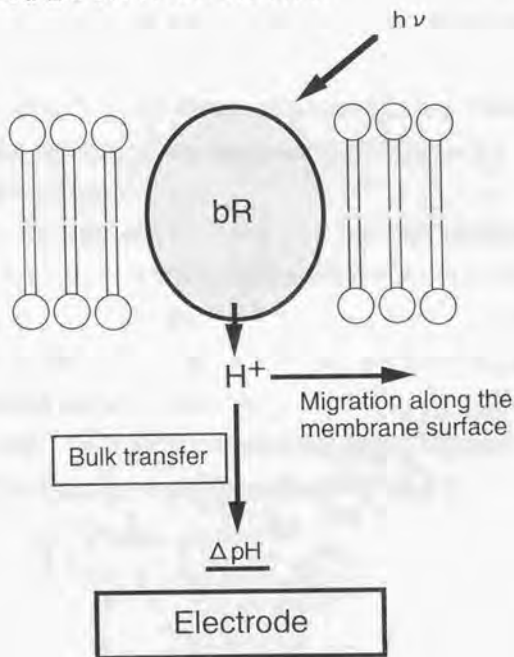


Fig. 2-2-10 Proton migration along the membrane surface and retarded surface to bulk transfer in the absence of buffer.

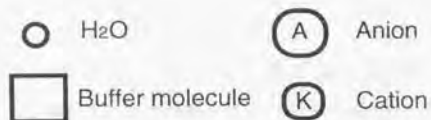
bR固定化膜のイメージ

キャスト法で固定したbR膜の存在状態に関するミクロなイメージを持つことは、光電流発生機構の理解を促進すると考えられる。そこで、考えられるbR固定化膜の想像図をFig. 2-2-11に示す。

bbR固定化膜を電解質溶液に接した状態にすると、膜は電解質溶液によって水和し、bR膜（正確には紫膜）と電極の間、またbR膜とbR膜の間には水分子、バッファー分子、および支持電解質が拡散していることが推測される（Fig. 2-2-11では空間が多いが、実際には多数の水分子や支持電解質などで埋められている。また、bR分子の大きさはFig.よりかはるかに大きい_n）。電極と、大きなbR分子と脂質分子の間には、水分子およびアニオンが入り込んで電極表面に吸着し、その外に水和カチオンが存在してヘルムホルツ層を形成する可能性が考えられる。

このように、バッファー分子がbR膜と電極との間に、もしくはbR膜間に拡散し、緩衝作用を持つため、本節で得られた結果のようにバッファーが光電流応答に大きく寄与すると考えられる。

本章では得られた結果を単純化して解釈することにより、光電流が電極近傍のpH変化に由来するという光電流発生機構を提案したが、bRを固定化した電極界面をミクロなイメージで明確にとらえるには至っていない。一般的に電極界面を分子レベルで語ることは困難であるが、最近赤外分光や放射光を利用した方法などで電極界面に関する情報を得ることが可能になりつつある。今後、bR固定化電極に関しても界面に関する詳細な構造を得て、高機能デバイス構築を分子レベルで行えるよう、さらに研究を進めるべきであろう。



Electrode

Electrolyte

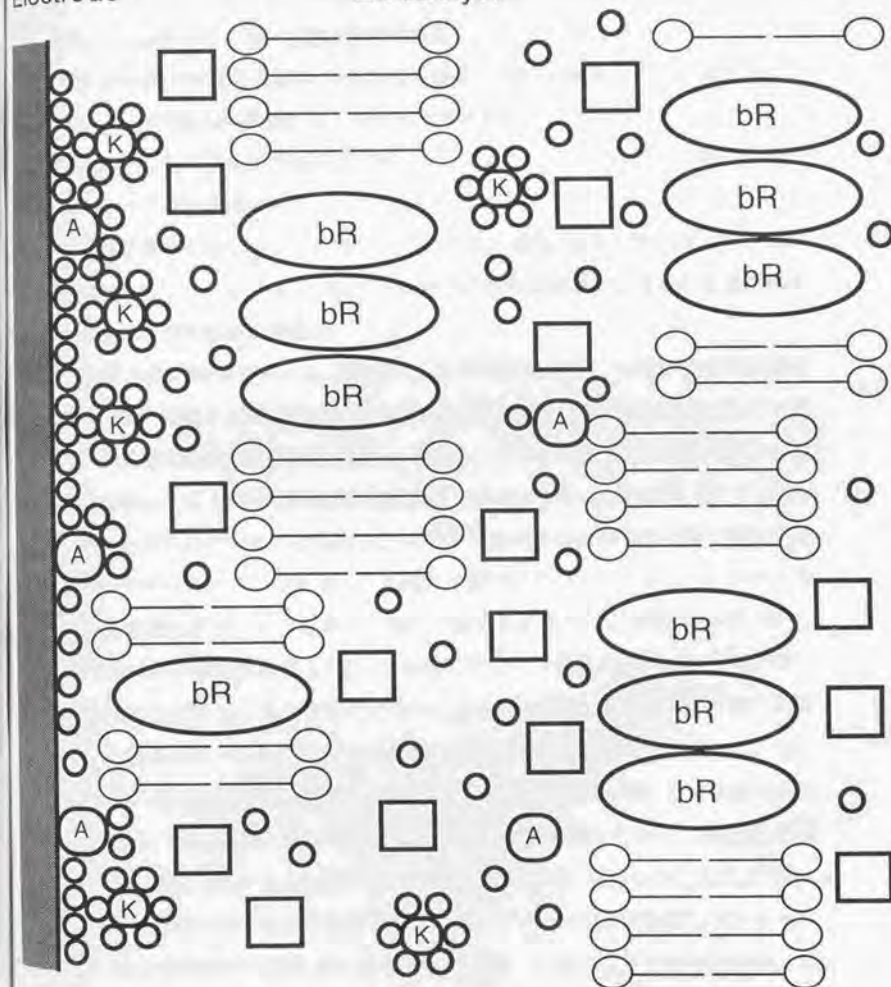


Fig. 2-2-11 Schematic illustration of bR immobilized electrode.

本章の総括 —bR分子内部の電荷移動に由来するシグナルとの相違—

本章の結果から、電極-溶液界面のbRから発生する一過性の光電流応答は、bRのプロトン放出・取り込みに依存した電極近傍のpH変化に由来することが明らかになった。そして、光電流の大きさはpH変化（正確には変化率と考えられる）と直接対応していることが示された。

従来のbRの光電応答はbR分子内部の電荷移動に由来することが報告されている。本章で明らかにしたようなbR分子外部に出た（あるいは引っ込んだ）プロトンによるpH変化が光電応答の発生源であるというメカニズムは新しい概念であり、ごく最近他のグループからも報告されはじめている^{11,12} こともあって今後重要視される可能性は大きい。あわせて、電極-溶液界面のbRの微分型光電流応答を、これまで報告されている分子内部の電荷移動に由来する光電応答と明確に区別する必要がある。

従来のbR配向膜のパルス光励起による光電応答では、シグナルの発生源を時定数から議論する場合が多く、シグナルの時定数に対応する光反応サイクルでの電荷移動過程を発生源と推測している。これらのシグナルは少なくとも3成分存在し、それぞれB1（ピコ秒領域）、B2（マイクロ秒領域）、B3（ミリ秒領域）と言われている。B1成分は、その時定数および光異性化がおこらないようなレチナールアナログを導入したbRから観測されないことから、レチナールの光異性化に伴うシッフ塩基の正電荷の動きに由来すると推測されている¹³。B2成分はその時定数から主にL→M過程でのシッフ塩基からAsp-85へのプロトン移動に由来すると考えられている¹⁴。B3成分に関しては起源は不明であるが、光反応サイクル後半での電荷移動との推測も行われている。しかし、B2、B3成分に関しては主に時定数からの推測であり、その由来はいまだ明確ではない。最近、Misraはプロトンを正常なタイミングで放出できない、204番目のグルタミン酸をグルタミンに置換した変異体（E204Q）を用いることによって、B2成分に外部へのプロトン放出が一部寄与している可能性を指摘している¹⁵。

これまでのbRの光電応答に関する研究では、本章のような電気化学的、物

理化学的アプローチが欠けており、本章で行った研究は新しい方法論を提示したといえる。例えば、B2には分子内部の電荷移動過程とプロトン放出過程に由来する2成分が混じっている可能性があるが、それを明確に分離するのにこれまでの方法では壁があると考えられ、本章で用いた方法が有効であると考えられる。現在使用している測定系はマイクロ秒オーダーの時間分解能を持たないためこのような実験を行うまでには至っていないが、今後パルス光励起による光電応答の測定系を整備しB2、B3成分の発生機構の解明に取り組んでいくことを考えている。

また、本章でのbR固定化はキャスト法で行っており、bR分子の配向はランダムである。bR分子内部の電荷移動に由来する光電応答は無配向膜ではほとんど観測することができない。それに対して、本章で提案した光電流発生機構では、光電流応答はbRによってプロトンが放出される、あるいは取り込まれ電極近傍の空間（bR累積膜の光電流応答が8~10層で飽和する結果^{15,16}から電極から40~50 nm程度の空間と推測される）のpHが変化することによって発生するので、bRの配向とは無関係である。このように分子配向の観点からも、本章で提案した光電流発生機構の妥当性が示される。bRの分子配向と光電流応答の関係は5章であらためて述べる。

参考文献

- 1) D. D. Perrin and B. Dempsey, "Buffers for pH and Metal Ion Control", Chap. 2, Chapman and Hall, London, (1974).
- 2) Van Slyke, *J. Biol. Chem.*, **52**, 525-570 (1922).
- 3) J. Heberle, J. Riesle, G. Thiedemann, D. Oesterheld and N. A. Dencher, *Nature*, **370**, 379-382 (1994).
- 4) H.-W. Trissl, *Biochim. Biophys. Acta*, **806**, 124-135 (1985).
- 5) G. I. Groma, G. Szabo and G. Varo, *Nature*, **308**, 557-558 (1984).
- 6) S. Y. Liu, T. G. Ebrey, J. Zingoni, R. Crouch, J. -M. Fang and K. Nakanishi, *Biophys. J.*, **51**, 134a (1987).
- 7) L. Keszthelyi and P. Ormos, *Biophys. Chem.*, **18**, 397-405 (1983).
- 8) P. Ormos, S. Hristova and L. Keszthelyi, *Biochim. Biophys. Acta*, **809**, 181-186 (1985).
- 9) S. Y. Liu and T. G. Ebrey, *Biophys. J.*, **54**, 321-329 (1988).
- 10) S. Y. Liu, *Biophys. J.*, **57**, 943-950 (1990).
- 11) B. Robertson and E. P. Lukashev, *Biophys. J.*, **68**, 1507-1517 (1995).
- 12) J. -P. Wang, S. -K. Yoo, L. Song and M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B*, **101**, 3420-3423 (1997).
- 13) J. -P. Wang, L. Song, S. -K. Yoo and M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B*, **101**, 10599-10604 (1997).
- 14) S. Misra, *Biophys. J.*, **75**, 382-388 (1998).
- 15) J. -A. He, L. Samuelson, L. Li, J. Kumar and S. K. Tripathy, *Langmuir*, **14**, 1674-1679 (1998).
- 16) 宮坂 力, 電子写真, **31**, 578-584 (1992).

第3章

バクテリオロドプシンの光電流応答と 光反応サイクル

3.1. 緒言

前章の結果から、bRの光電流応答はbR分子のプロトン放出・取り込みに依存した電極近傍のpH変化に由来することが明らかになった。このことから、電極-溶液界面のbRからの光電気化学応答がbRのプロトンポンプ活性を反映することが期待される。一方、第1章で述べたように、bRの光反応サイクルはpHによって大きく変化する⁹⁾。プロトン放出と取り込みの段階について簡単にまとめると、中性では約100 μ sでプロトン放出が起こった後、数msでプロトンの取り込みが起こる。それに対し、酸性ではプロトンの放出と取り込みの順序が逆転する。アルカリ性では、プロトン放出は正常なタイミングで起こるが、プロトン取り込みがpHの上昇とともに遅くなる。

bRの光電流発生機構が前章で提案したメカニズムに従うならば、このようなbRの光反応サイクルのpH依存性は光電流応答を大きく変化させることが予想される。そこで、本章では、電解質溶液のpHを広い範囲で変化させ、光電流応答に対する影響を検討した。それとともに、光電流応答とbRの光反応サイクルの対応を調べた。

3.2. 実験方法

実験方法は基本的に2章と同様である。

568 nmでの吸光度が1 (光路長1 cm) になるよう純水に懸濁させた溶液 50 μ LをSnO₂電極上1×1 cmに広げ、室温で乾燥させて固定化した。

電解質溶液にはバッファーとしてクエン酸三ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、四ホウ酸ナトリウムをそれぞれ10 mM含む0.1 Mの硫酸ナトリウム水溶液を用い、塩酸と水酸化ナトリウム溶液でpH調整を行った。

3.3. 結果

光電流応答パターン

Fig. 3-1に各pHでの典型的な光電流応答パターンを示す。bRの光電流応答パターンは電解質溶液のpHに大きく依存した。電解質溶液が中性のときは、光照射の瞬間にはカソード方向に一過性の光電流が、光照射をやめた瞬間にはアノード方向に一過性の光電流が発生した。電解質溶液が酸性の場合は中性の場合とは光電流応答パターンが逆転した。すなわち、光照射の瞬間にはアノード方向に一過性の光電流が、光照射をやめた瞬間にはカソード方向に一過性の光電流が発生した。また、アルカリ性の場合は、光照射の瞬間は中性の場合と同様に一過性のカソード光電流が発生したが、光照射をやめた瞬間のアノード光電流が著しく小さくなる傾向がみられた。この光電流応答の減少はpHの上昇とともに顕著になり、アノード光電流はpH 10程度で観測できなくなった。

各pHにおいて、光電流の作用スペクトルはbRの吸収スペクトルとほぼ一致したことから、光電流がbR由来であると確認した。

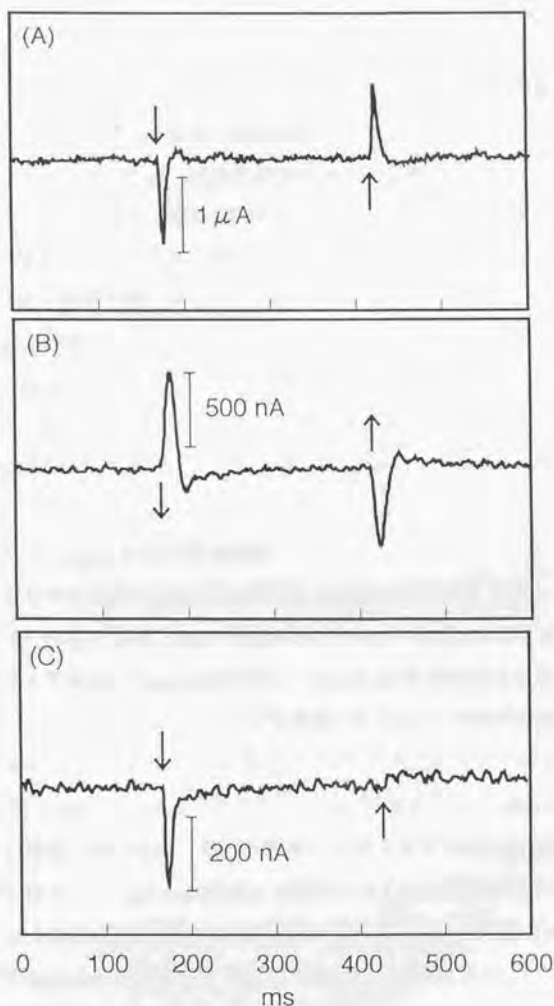


Fig. 3-1 Photocurrent response patterns from bR-SnO₂/electrolyte interfaces at various pH. (A) pH 7.0, (B) pH 3.4, (C) pH 9.6. The down and up arrows denote light on and off, respectively. Electrode potential, 0.0 V vs. Ag/AgCl. Light intensity, 1.3×10^2 nW cm⁻². Electrolyte, 0.1 M Na₂SO₄ with a mixture of buffers consisting of 10 mM sodium citrate, 10 mM sodium phosphate and 10 mM sodium borate. The pH value was controlled with HCl or NaOH.

光電流応答のpH依存性

Fig. 3-2に光照射時の光電流強度のpH依存性を示す。光照射の瞬間に発生する光電流はpH 2~12の広い範囲で観測することができた。pH2付近で光電流応答が観測できなくなるのは、85番目のアスパラギン酸 (Asp-85) がプロトン化することにより、プロトン輸送が起こらなくなるためであると考えられる。光電流強度が極大となるところは必ずしもbRのプロトンポンプ活性と一致しないが、これは第2章第2節で述べたように緩衝能の影響であると考えられる。

光電流応答が逆転するpHはおおよそ5.2であり、bRの光反応サイクルにおいてプロトンの放出と取り込みの順序が逆転するpH²³⁾ とほぼ一致した。このことから光電流の極性の反転は、プロトンの放出と取り込みの順序の逆転を反映していると推測される。

アルカリ性でのLight-off光電流の挙動

光照射をやめた瞬間に発生する光電流 (Light-off光電流) はpHの上昇にしたがって小さくなる。まず、pHが中性およびアルカリ性のときの光を照射した瞬間に発生する光電流 (Light-on光電流) とLight-off光電流の大きさのpH依存性をFig. 3-3に示す。Light-on、Light-off光電流ともにpH 7.5付近を極大としたベル型の曲線を示した。これは、リン酸バッファーを使用したことによる緩衝能の影響である。Light-off光電流の大きさは、pH 7程度までは、Light-on光電流より若干小さい程度であったが、電解質溶液のpHが上昇するとLight-off光電流のほうが大きく減少し、Light-on光電流との差が大きくなる傾向が見られた。

Light-off光電流の減衰挙動を明確に示すため、Light-off光電流強度 (I_{off}) を同じpHでのLight-on光電流強度 (I_{on}) で規格化した (Fig. 3-4)。pH 7程度までは $I_{\text{off}}/I_{\text{on}}$ は0.9程度であったが、それよりpHが上昇するとその比は単調に減少し、pH 10程度で0となった。NaOHを用いてpHを上げた場合 (○) とHClを用いてpHを下げた場合 (●) は同一曲線上にのることから、Fig. 3-4のLight-off光電流の減衰挙動は、bRの不可逆的なアルカリ変性によるものではないとわかる。

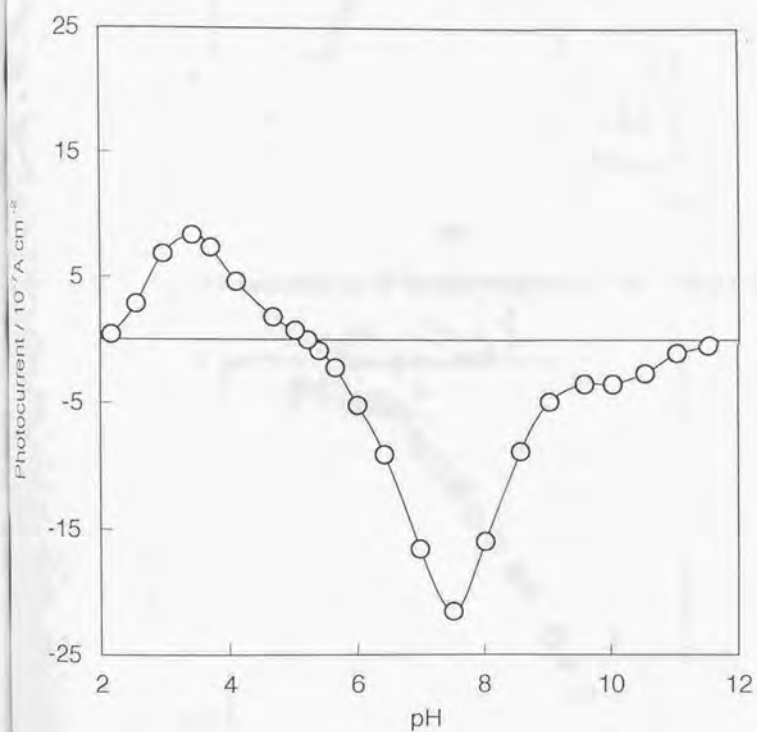


Fig. 3-2 pH dependence of the peak photocurrent by turning the light on. Experimental conditions were the same as in Fig. 3-1.

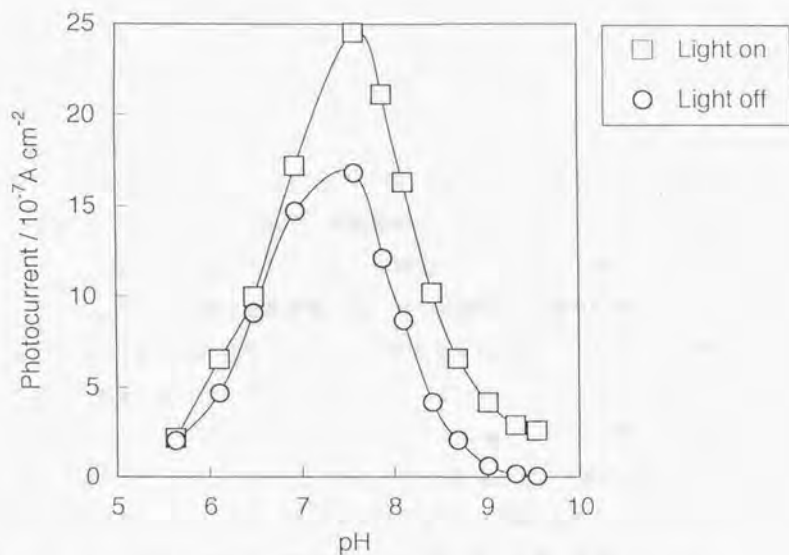


Fig. 3-3 pH dependencies of the photocurrent at light-on and at light-off.

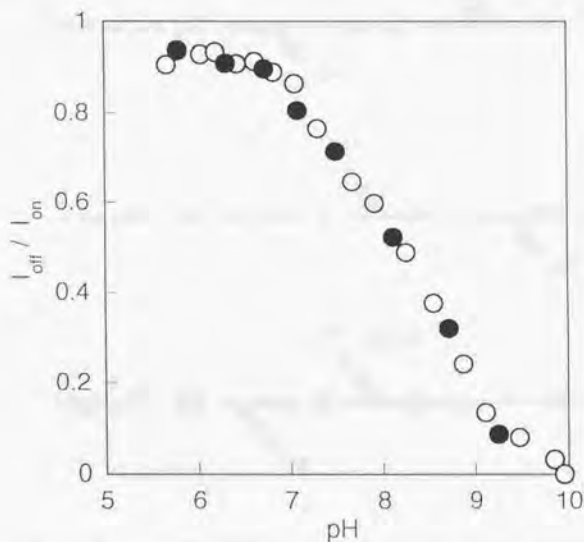


Fig. 3-4 pH dependence of amplitude ratio of the photocurrent at light-off (I_{off}) to that at light-on (I_{on}). Electrolyte pH was raised with NaOH (\circ), or lowered with HCl (\bullet).

3.4. 考察

bR光反応サイクルとの対応

得られた特徴的な光電流応答のpH依存性は、bRの光反応サイクルから次のように解釈できる。Fig. 3-5は各pHでの典型的なbRの光反応サイクルである。中性では、M中間体の生成とともにプロトン放出が起こり、その後M中間体の減衰とともにプロトンの取り込みが起こる。それに対して、酸性の場合はプロトン輸送経路の放出口付近でプロトンを放出する204番目のグルタミン酸(Glu-204)が解離できないため、正常なタイミングでプロトンを放出することが出来ない^{5,6)}。そのため、プロトンの取り込みが先に起こり、その後シッフ塩基からのプロトンアクセプターであるAsp-85から直接プロトン放出が起こる。また、アルカリ性ではプロトンの放出は中性の場合と同様に正常なタイミングで起こるが、プロトンの取り込み速度がpHの上昇に従って遅くなる^{7,10)}。

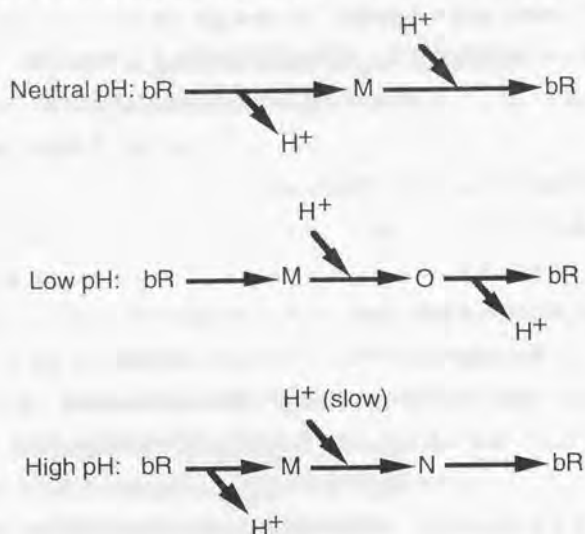


Fig. 3-5 Simplified bR photocycle at neutral, low and high pH.
M, N and O denote the intermediates in the bR photocycle.

bRの光電流応答は第2章で述べたように、bRのプロトン放出・取り込みに依存した電極近傍のpH変化に由来する。電解質溶液が中性の場合には、Fig. 3-5に示すようにプロトン放出がまず起こるため、光照射の瞬間に電極近傍の一時的にpHは低下する。これが SnO_2 電極表面電位のアノード方向へのシフトを誘起し、その結果、一過性のカソード光電流が発生する。その後はプロトン放出と取り込みが釣り合った光定常状態となるため、光電流は観測されない。光照射をやめた瞬間には最後にプロトンの取り込みが起こるため、電極近傍のpHは一時的に上昇し、 SnO_2 電極の表面電位のカソード方向へのシフトを誘起する。この結果として、一過性のアノード光電流が発生する。

電解質溶液が酸性の場合は、中性の場合とは逆に光照射の瞬間にまずプロトンの取り込みが起こり、電極近傍のpHは一時的に上昇する。この結果として、光照射時には一過性のアノード光電流が発生する。また、光照射をやめた瞬間には、最後にプロトンの取り込みが起こり、電極近傍のpHは一時的に低下する。これが、一過性のカソード光電流を発生させる。光電流応答が逆転するpHとプロトン放出と取り込みの順序が逆転するpHがほぼ等しいことは、上記の応答パターン逆転の解釈を支持する。

また、アルカリ性の場合には、光照射の瞬間は中性の場合と同様にM中間体の生成とともにプロトン放出が起こるため、光電流応答も中性の場合と同様にカソード応答となる。しかし、光反応サイクルの後半が中性の場合とは大きく異なるため、アルカリ性では光照射をやめた瞬間の応答も中性の場合に比べて異なる。すなわち、最後に起こるプロトンの取り込みがpHの上昇とともに遅くなる²¹⁰⁾ため、光照射をやめた瞬間の電極近傍のpH変化率($\Delta\text{pH} / \Delta t$)が小さくなる。光電流の大きさは第2章第2節で示したように $\Delta\text{pH} / \Delta t$ に対応するので、pH上昇とともにLight-off光電流の大きさは減少する。

このように電極・溶液界面のbRの光電流応答は、bRの光反応サイクルと密接に対応することが明らかとなった。それとともに、bRのプロトン輸送に関する有用な情報、具体的には

○bRのプロトン放出と取り込みが逆転するpHに関する情報

○アルカリ性でのbRのプロトン取り込み速度の低下に関する情報

を与えうることが示唆された。次章では、光電流応答のpH依存性を用いて、現在その役割がわかっていない金属イオンを置換したbRに関してこの2点の情報を得ることを試みた。

アルカリ性でのプロトン取り込み速度の低下とLight-off光電流の減衰挙動

時間分解分光法によるbRの光反応サイクルに関する研究から、pH7以上ではpHの上昇にしたがって光反応サイクルの後半、すなわちM中間体の減衰が遅くなることが報告されている^{7,10}。これは、96番目のアスパラギン酸(Asp-96)によるbR分子外からのプロトン取り込みが遅くなることに由来する。Fig. 3-6にM中間体の減衰のpH依存性を示す。pH 7を越えると、M中間体の減衰(410 nmの吸光度変化)が明瞭に2成分に分かれる(挿入図を参照)。このうち、速い成分はAsp-96からシッフ塩基へのプロトン移動に対応し、遅い成分は分子外からAsp-96へのプロトン移動に対応する⁷。遅い成分であるプロトン取り込みの減衰時間の対数 $\log(\tau)$ はpHに対して直線関係にある。すなわち、 $\tau = A \exp(\text{pH})$ (定数項をAとしてまとめる)とすることができる。

一方、Light-off光電流の大きさ、 I_{off} は、bRのプロトン取り込みによるpH変化率 $\Delta\text{pH}/\Delta t$ に比例すると考えられる。 Δt がプロトン取り込みの減衰時間に比例するとして $\Delta t = A' \exp(\text{pH})$ とすると、 I_{off} と $\Delta\text{pH}/A' \exp(\text{pH})$ は比例する。ここで、Light-off光電流の減衰挙動をFig. 3-7のように $I_{\text{off}}/I_{\text{on}}$ で考え、これによってbRのプロトンポンプ活性のpH依存性や緩衝能の影響を補正し ΔpH が一定値であるとして Δt の影響のみを考えると、 $I_{\text{off}}/I_{\text{on}} = A'' / \exp(\text{pH})$ (定数項をA''としてまとめる)とみなすことができる。したがって、Light-on光電流に対するLight-off光電流の比、 $I_{\text{off}}/I_{\text{on}}$ の逆数の対数はアルカリ性領域でpHに比例することが予想される。実際に $I_{\text{off}}/I_{\text{on}}$ の逆数の対数をpHに対してプロットした結果をFig. 3-7に示す。pH>約9の範囲で $I_{\text{off}}/I_{\text{on}}$ の逆数の対数はpHと直線関係にあった。ま

た、 $\text{pH} < \text{約} 9$ で直線からはずれる挙動も Fig. 3-6 の減衰が遅い成分の挙動と同様な傾向がみられた。

非常におおざっぱな近似を用いたが、この結果から定性的に Light-off 光電流のアルカリ性での減衰挙動はプロトン取り込み速度が遅くなることと直接対応していることが示された。

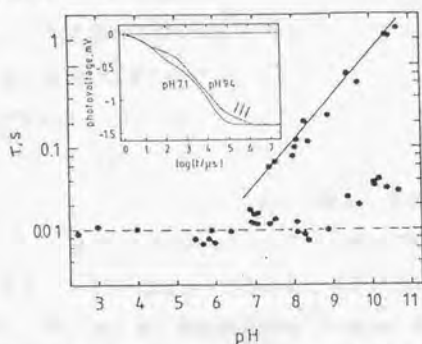


Fig. 3-6 The fast and slow decay times τ of the photocycle intermediate M of bR (410 nm) are plotted logarithmically as a function of pH. (Ref. 7)

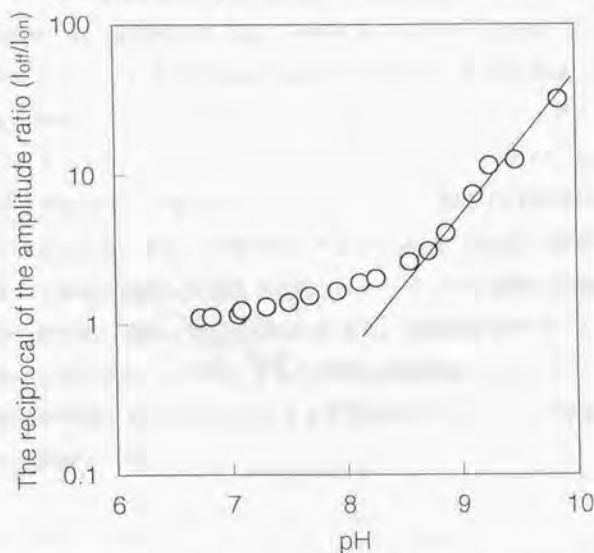


Fig. 3-7 pH dependence of the reciprocal of the amplitude ratio (I_{0H}/I_{0M}) in Fig. 3-4.

プロトンポンプ活性測定への応用の可能性

これまで、bRのプロトンポンプ活性は、bRをリボソームに取り込ませ、光照射によってその懸濁液のpHを測定する方法^{2,3)}と、ピラニンを始めとしたpH感受性色素を溶液中共存させたbR懸濁液に光照射を行い、pH感受性色素の吸収変化を測定する方法^{4,5,10)}が主流であった。

リボソームを用いたときは、測定時間が分単位であり、リアルタイム測定として用いることはできない。また、サンプル間のデータのばらつきも大きい。

一方、pH感受性色素を用いた場合は、時間分解分光法との併用によりプロトンの放出・取り込みが実時間で検出することができ、近年多く行われている測定法である。しかし、pH感受性色素を用いた測定の問題点として、bRの吸収と重ならない色素を選ばなければいけないこと、測定できるpH範囲が色素のpKa付近の狭い範囲（2 pH単位以下）であることが挙げられる。現状では、ピラニンが主に用いられており多くの成果を挙げているが、やはり用いられるpH範囲は狭い。bRのプロトンポンプ活性のpH依存性はプロトン輸送機構を考えていく上で非常に興味深い問題であるが、pH感受性色素を用いたプロトンポンプ活性測定ではこの要求に応えることができないと考えられる。

それに対して、本論文で研究を進めているbRの光電流応答は、この両者の問題点を解決する可能性を秘めている。すなわち、パルスレーザーと高速測定回路（現状ではまだそのセットアップができていないが）を用いることにより、pH感受性色素を用いた場合のようなプロトンポンプ活性の実時間計測が可能であると考えられる。また、本章で示したようにpH 2~12の広い範囲でbRのプロトンポンプ活性を反映した応答が観測され、リボソームを用いた測定に変わることが示された。また、再現性がよいことも、光電流応答を用いるうえで大きな魅力となるであろう。今後、さらに詳細に光電流応答とbRプロトンポンプ活性の対応を明確にしていくことによって第3のプロトンポンプ活性測定法となることが期待される。

参考文献

- 1) J. K. Lanyi, *Biochim. Biophys. Acta*, **1183**, 241-261 (1993).
- 2) Y. Takeuchi, K. Ohno, M. Yoshida and K. Nagano, *Photochem. Photobiol.*, **33**, 587-592 (1981).
- 3) H. Garty, G. Klemperer, M. Eisenbach and S. R. Caplan, *FEBS Lett.*, **81**, 238-241 (1977).
- 4) G. Varo and J. K. Lanyi, *Biochemistry*, **29**, 6858-6865 (1990).
- 5) H. -T. Richter, L. S. Brown, R. Needleman, J. K. Lanyi, *Biochemistry*, **35**, 4054-4062 (1996).
- 6) S. P. Balashov, R. Govindjee, E. S. Imasheva, S. Misra, T. G. Ebrey, Y. Feng, R. K. Crouch and D. R. Menick, *Biochemistry*, **34**, 8820-8834 (1995).
- 7) H. Otto, T. Marti, M. Holz, T. Mogi, M. Lindau, H. G. Khorana and M. P. Heyn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9228-9232 (1989).
- 8) J. B. Ames and R. A. Mathies, *Biochemistry*, **29**, 7181-7190 (1990).
- 9) L. Zimanyi, Y. Cao, R. Needleman, M. Ottolenghi and J. K. Lanyi, *Biochemistry*, **32**, 7669-7678 (1993).
- 10) Y. Cao, L. S. Brown, L. S. Needleman and J. K. Lanyi, *Biochemistry*, **32**, 10239-10248 (1993).

第4章

バクテリオロドプシンに対する 金属イオンの効果



Fig. 1. The bacteriorhodopsin cycle and the effect of metal ions.

4.1. 緒言

bR分子には数個の金属イオンが結合しており、その金属イオンを取り除くと通常の紫色 ($\lambda_{\text{max}} = 568 \text{ nm}$) から青色 ($\lambda_{\text{max}} = 605 \text{ nm}$) に変化する¹²⁾ (Fig. 5-1)。青色を呈したbRに金属イオンを添加すると、可逆的に紫色に戻る。青色を呈したbR (Blue-bR) は、プロトン輸送を行うことができず、M中間体も生成しない¹³⁾。これはシッフ塩基からのプロトンを受け取る役割を果たしている85番目のアスパラギン酸 (Asp-85) がプロトン化しているためである。

金属イオンの結合位置は、2つのhigh affinity site ($K_1 = 3.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, $K_2 = 6.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) と4-6つのlow affinity site ($K_3 = 3.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) の存在が示された¹⁴⁾。そのうち、2つのhigh affinity siteのうち低いほうのサイトがcolor regulationに機能していることが示唆されている。しかし、具体的な結合サイトに関してはまだ明らかになっていない。

レチナール周辺にあって水素結合ネットワークを形成しているアミノ酸 (Asp-85, Asp-212, Arg-82, Tyr-185) を置換し、カルシウムイオン結合に対する影響を調べたところ、low affinity siteにはほとんど影響を与えなかったが、high affinity siteの結合定数を小さくし、プロトン輸送経路の放出側チャネルとの相互作用が明らかになった¹⁵⁾。また、最近の¹³C固体NMRの結果では、プロト

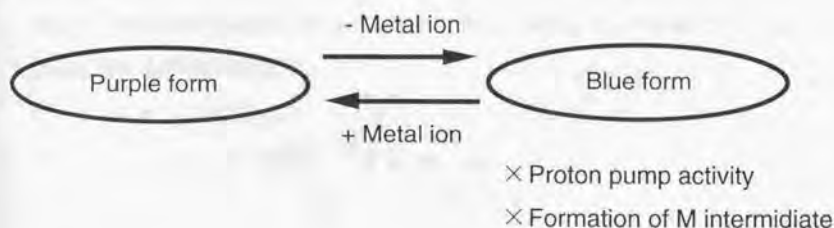


Fig. 5-1 Relationship between purple bR and blue bR.

ン放出口付近に存在する196番目のアラニン (Ala-196) が金属イオンと相互作用することも示され、この付近にhigh affinity siteがある可能性が示唆された¹⁰⁾。また、プロトン放出口に存在する4個のグルタミン酸をグルタミンに置換すると、結合定数に大きな影響を与えることも報告されており¹¹⁾、金属イオンの結合位置がプロトン放出口付近に存在する可能性は大きい。

これまでの金属イオンに関する研究では、bRのオブシシフト (レチナールのアポタンパク質と相互作用することによる吸収極大波長のシフト) に対する影響に主に注目を集めてきた。しかし、プロトン輸送経路の近くに存在した場合、その静電的影響によりプロトン輸送活性に大きく影響を与える可能性が考えられる。実際、ランタンイオンはbRの光反応サイクルの後半部分、すなわちプロトンの取り込みを著しく遅くするという報告もある¹²⁾。現在、bRのプロトン輸送機構として、経路に存在するアミノ酸残基と水分子の関与した議論が盛んであるが、金属イオンもプロトン輸送に大きく関与している可能性は否定できない。

前章では、電極-溶液界面のbRの光電流応答がbRのプロトン輸送に関する情報、具体的にはプロトンの放出と取り込みの順序が逆転するpHとプロトン取り込み速度の低下に関する情報を与えることを示した。そこで、本章ではそれをbRのプロトンポンプのメカニズム研究へ応用することを試みた。bRのプロトン輸送に対する金属イオンの役割を明らかにすることを最終目的として、金属イオン交換bRの光電流応答のpH依存性を調べ、金属イオンがbRのプロトン輸送に与える影響を考察した。

4.2. 実験方法

常法に従い精製した紫膜を陽イオン交換カラム (BioRad, AG-50W) に通し、金属イオンを除去した。得られた青膜を純水に懸濁させ、35000 rpm、4℃、30分の超遠心操作を2回行い、洗浄を行った。その青膜にさまざまな金属塩の水溶液を少量添加し、金属イオンを交換したbRを作製した。金属イオン交換bRの懸濁液の568 nmでの吸光度が1 (光路長 1 cm) になるよう調整し、その50 μ LをSnO₂電極上1×1cmに広げ乾燥させた。

光電流測定は2章と同様である。金属イオンの交換を防ぐため、支持電解質にはbRに含まれている金属イオンと同種の金属塩を用いた。

4.3. 結果

Purple-bRとBlue-bR

Fig. 4-2にPurple-bRとBlue-bRの吸収スペクトルを示す。Purple-bRは568 nmに吸収極大を持つのにに対し、Blue-bRは603 nmに吸収極大を持つ。

Fig. 4-3に、Blue-bRにCaCl₂を添加したときの吸収スペクトル変化を示す。bRの濃度は完全に紫に戻ったときのモル吸光係数 $\epsilon = 63000$ から求めたところ、4.8 μ Mであった。Ca²⁺濃度の増加にしたがって、吸収極大は短波長側にシフトし、Ca²⁺濃度がbR濃度の2倍である10 μ Mになると完全に紫になった。この吸収スペクトル変化の過程で、574 nmに等吸収点の存在が確認できた。Blue-bRにCaCl₂を添加したときの差スペクトル (Fig. 4-4) では、Ca²⁺濃度の増加とともに630 nm付近の吸収の減少と530 nm付近の吸収の増加が同時に進行した。

[bR] : [Ca²⁺] = 1 : 2でbRが完全に紫に戻ることは、bR分子の金属イオン結合位置のなかで2番目に結合定数が高いサイト (Second high affinity site) がbRのColor regulationを行っていることを示す過去の報告²³⁾ を支持する結果である。また、このような実験を通して、金属イオン交換bRを作製するときに必要な金属塩の量を明らかにすることができた。

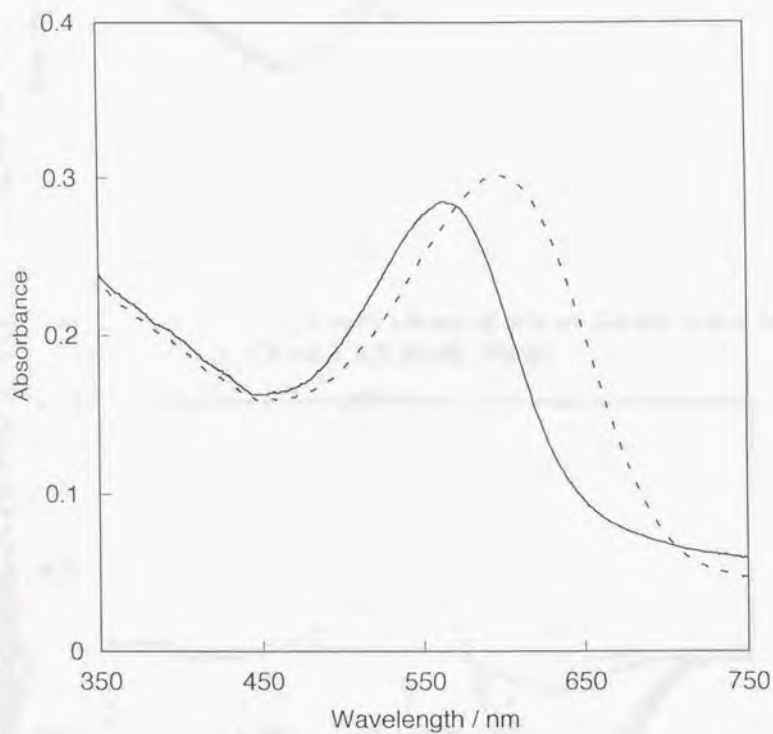


Fig. 4-1 Absorption spectra of purple-bR (solid curve) and blue bR (dotted curve).

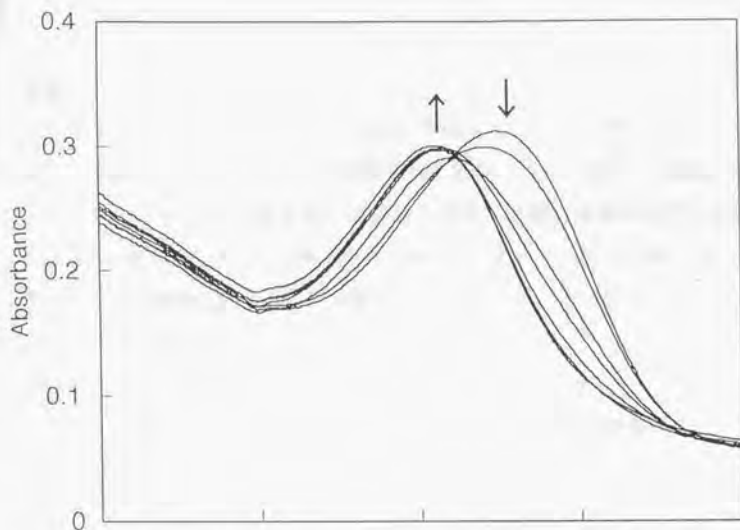


Fig. 4-3 Spectral changes upon addition of calcium chloride to blue-bR.
 $[bR]=4.8 \mu M$, $[CaCl_2]=0, 2.5, 5, 10, 20, 30 \mu M$.

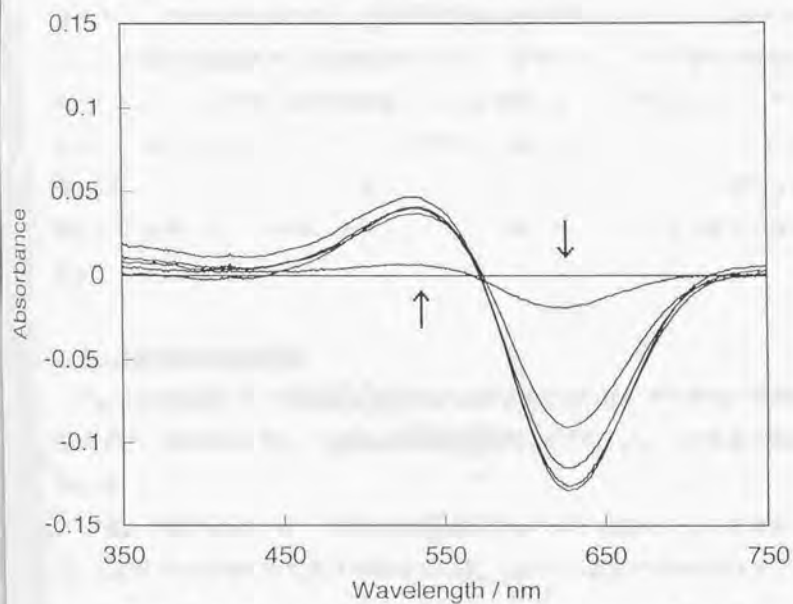


Fig. 4-4 Different spectra of blue bR in the presence of metal ions.
 $[bR]=4.8 \mu M$, $[CaCl_2]=0, 2.5, 5, 10, 20, 30 \mu M$.

金属イオン交換bRの光電流応答

金属イオンを交換したbRを SnO_2 電極に固定化し定常光を照射すると、前章までと同様に光照射の瞬間と光照射をやめた瞬間にのみ一過性の光電流が発生した。そのpH依存性も基本的には前章と同様、電解質溶液が中性のときはLight-on光電流はカソード方向であり、酸性になるとアノード方向となって光電流の極性が逆転した。以下に金属イオン交換bRのpH依存性のうち、前章で示した2つのポイント

○bRのプロトン放出と取り込みが逆転するpHに関する情報

○アルカリ性でのbRのプロトン取り込み速度の低下に関する情報
について述べる。

光電流応答の極性が逆転するpH

Fig. 4-5に金属イオンを交換したbRのLight-on光電流のpH依存性を示す。どの金属イオン交換bRにおいても、電解質溶液のpHが中性のときには一過性のカソード光電流が観測され、pHが酸性になると一過性のアノード光電流が観測された。しかし、光電流の極性が逆転するpHは金属イオンにより異なった。そのpHは、一価の金属イオンでは5.1~5.3程度、二価の Mg^{2+} 、 Ca^{2+} イオンでは4.7程度、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} では4.3程度、三価の La^{3+} イオンでは3.9程度であり、一般的な傾向として金属イオンの価数の増加にしたがって酸性側にシフトする傾向が見られた。

Light-off光電流の減衰挙動

Fig. 4-6に金属イオンを交換したbRのアルカリ性でのLight-off光電流の減衰挙動を示す。前章のように、Light-off光電流は同じpHでのLight-on光電流で規格化した。

一価、二価の金属イオンではその減衰挙動はほぼ同じ曲線となったのに対して、 La^{3+} イオンは明らかに違う挙動を示した。pH 5~7付近でその比は0.3~0.4

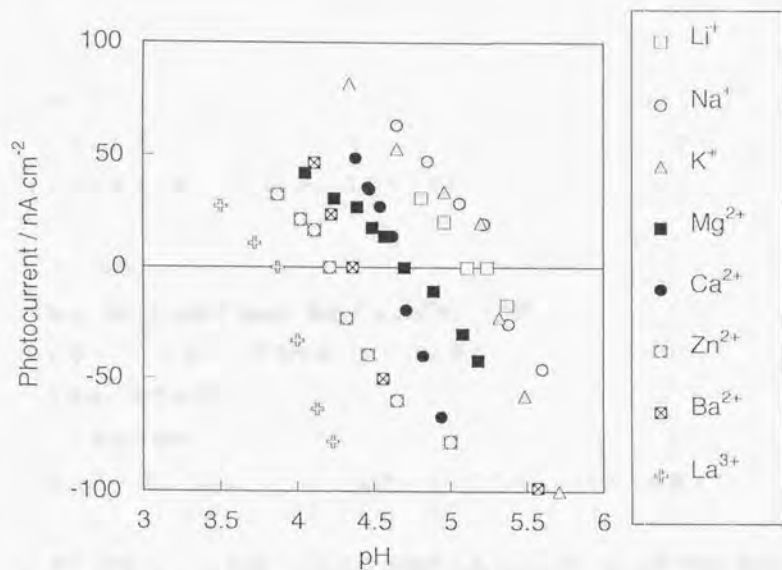


Fig. 4-5 pH dependence of the photocurrent for the cation-substituted bRs.

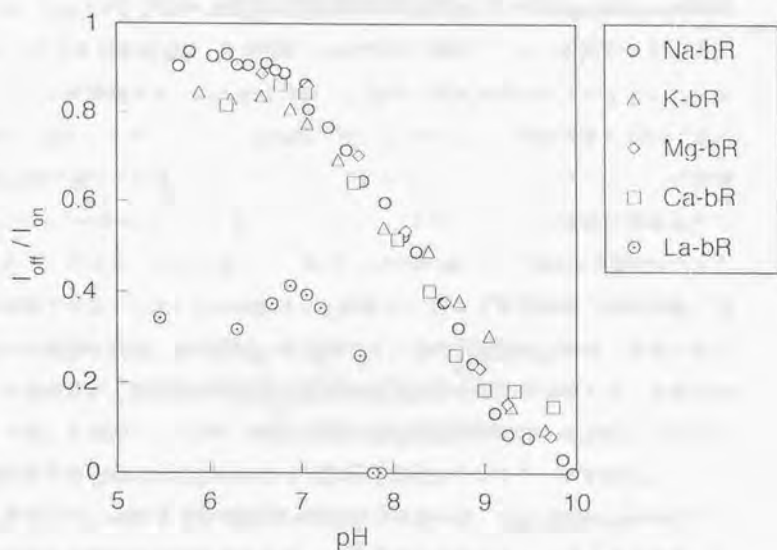


Fig. 4-6 pH dependence of the amplitude ratio of the photocurrent at light-off to that at light-on, for cation-substituted bRs.

程度と他のイオンに比べて明らかに小さく、pH 7以上で急激に減少し0となった。すなわち、過去の分光学的結果と同様に光電気化学的のも La^{3+} はプロトン取り込み速度を著しく遅くすることが示された。

4.4. 考察

光電流の極性が逆転するpHに金属イオンが与える影響

金属イオンがbRの光電流応答に大きな影響を与えることが示された。とくに光電流の極性が逆転するpHは金属イオンに大きく依存した。3章で述べたように光電流の極性が逆転するpHはbRのプロトン放出と取り込みの順序が逆転するpHを反映していることから、金属イオンがそのpHに大きな影響を与えていることが示された。

現在提案されているbRのプロトン放出のメカニズムは、タンパク質の構造変化により鍵となる酸性アミノ酸残基の pK_a が微妙に調節されることで説明される。Fig. 4-7にプロトン放出に重要な役割を果たしているAsp-85とGlu-204の pK_a の相互依存性を示す。L中間体→M中間体の過程でシッフ塩基からAsp-85にプロトンが移動する。Asp-85とプロトン放出口付近に存在するGlu-204の pK_a は相互に依存しており、このAsp-85のプロトン化によって基底状態では9.4であるGlu-204の pK_a が4.7まで低下する^(9,10)。その結果としてGlu-204のプロトンが解離し、Glu-194を経由して拡散的にプロトンを外部に放出する機構が提唱されている。このメカニズムに従うと、酸性（pHが約5以下）ではGlu-204のプロトンが解離できないため、L→M過程の正常なタイミングでプロトン放出が起これないと推測される。このため、光反応サイクルの最後にAsp-85から直接プロトンが放出され、結果的にプロトン放出と取り込みの順序が逆転すると解釈されている。すなわち、プロトン放出と取り込みの順序が逆転するpHは、プロトン放出基であるGlu-204の pK_a によって決定されることが考えられる。

金属イオンの正確な結合位置は明らかではないが、high affinity siteのひとつがプロトン放出口付近に存在することが示唆されている。このような位置に存

在する金属イオンがプロトン放出に
関与するGlu-204と静電的
相互作用をすることにより、こ
れらのアミノ酸残基の pK_a を変
化させることが考えられる。一
般に、金属イオンの正電荷はプ
ロトン性配位子の酸アニオン
(共役塩基)を安定化する。そ
の静電相互作用による安定化に
より、酸アニオンの pK_a は低下
すると考えられる。

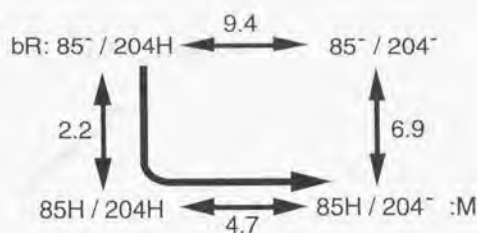
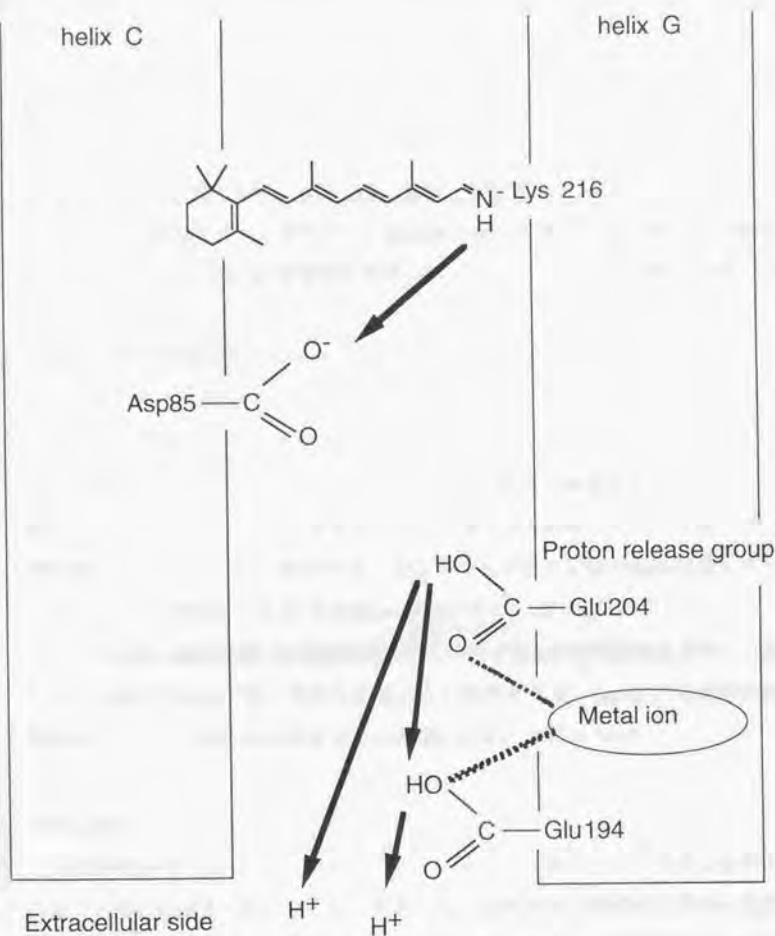


Fig. 4-7 pK_a interaction between
Asp-85 and Glu-204.

そこで、Fig. 4-8に金属イオンによるbRのプロトン放出基の pK_a 調節機構を新
たに提案した。プロトン放出口付近に存在する金属イオンがプロトン放出基で
あるGlu-204またはGlu-194と静電的に相互作用することによって、その解離状
態を安定化する。金属イオンの価数が多いほど、あるいは金属イオンとカル
ボキシル基の相互作用がより強いほど、グルタミン酸残基の解離状態がより安
定化され、その pK_a が低下する。したがって、光電流応答が逆転するpHも金属
イオンの価数の増加にしたがって低下する。

また、静電的効果のみではなく、金属イオンが結合することによるタンパク
質のコンフォメーション変化(微細構造変化)がプロトン放出基の pK_a へ影響
する可能性も現状では否定できない。今後、金属イオンの結合位置とその周囲
環境の分子レベルでの理解を進めることで、金属イオンのプロトン輸送に対す
る役割を明確にすることが期待される。

現在、bRのプロトンポンプ機構において金属イオンの効果は考慮されてい
ない。しかし、本章の結果は、金属イオンがプロトンポンプにおいてプロトン
放出基の pK_a 制御という重要な役割を果たしている可能性を示した。さらに分
光学測定などを通して、金属イオンの役割について理解を深めることが必要で



Interaction between Proton release group and Metal ion

↓

pK_a Regulation of Proton release group

Fig. 4-8 Proposed mechanism of pK_a regulation of proton release group by metal ion.

あろう。

Light-off光電流の減衰挙動に金属イオンが与える影響

La^{3+} は他の金属イオンと異なり、Light-off光電流を著しく減少させた。前章で述べたように、Light-off光電流の減衰はbRのプロトン取り込み速度が遅くなることに由来する。

過去の時間分解分光法の結果から、 La^{3+} はM中間体の減衰を著しく遅くすることが示されている。 La -bRのM中間体の寿命はpH8でwild-typeの1000倍程度、すなわち、秒オーダーにまで延びる。これは、wild-typeでは高アルカリ性(pH11程度)に対応する寿命であり、Light-off光電流が観測されないことと矛盾しない。このようにM中間体減衰が著しい遅くなるのは、プロトン取り込み側表面に La^{3+} が非特異的に吸着することによってプロトン取り込みを遅らせることによるとの推測が行われている。

La^{3+} のLight-off光電流に対する影響は、このような La^{3+} に特徴的なプロトン取り込みの遅れに由来すると考えられる。この結果からも、Light-off光電流の減衰挙動はプロトン取り込み速度のよい指標になることが示された。

本章の総括

光電気化学的方法により、bRのプロトン輸送に金属イオンが大きな影響を与えていることを示した。得られた結果から、金属イオンがbRのプロトン放出基の pK_a を制御するメカニズムを新たに提案した。今後、bRの暗順応速度測定によるGlu-204の pK_a 同定や時間分解分光、赤外分光法などの分光学的手段によってプロトン放出に対する金属イオンの関与をより明確にしていくことが望まれる。

参考文献

- 1) Y. Kiumura, A. Ikegami and W. Stoeckenius, *Photochem. Photobiol.*, **40**, 641-646 (1984).
- 2) C. -H. Chang, J. -G Chen, R. Govindjee and T. Ebrey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 396-400 (1985).
- 3) R. Jonas, Y. Koutalos and T. G. Ebrey, *Photochem. Photobiol.*, **52**, 1163-1177 (1990).
- 4) Y. N. Zhang, L. L. Sweetman, E. S. Awad and M. A. El-Sayed, *Biophys. J.*, **61**, 1201-1206 (1992).
- 5) Y. N. Zhang, M. A. El-Sayed, M. L. Bonet, J. K. Lanyi, M. Chang, B. Ni and R. Needleman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1445-1449 (1993).
- 6) S. Tuji, H. Konishi, S. Inoue, S. Yamaguchi, M. Tanio, R. Needleman, J. K. Lanyi and H. Saïto, 8th International Conference on Retinal Proteins, 1P-04 (1998).
- 7) C. Sanz, T. Lazarova, F. Sepulere, E. Querol and E. Padros, 8th International Conference on Retinal Proteins, 1P-26 (1998).
- 8) L. A. Drachev, V. N. Frolov, A. D. Kaulen, E. A. Liberman, S. A. Ostroumov, V. J. Plakunova, A. Y. Semenov and V. P. Skulachev, *J. Biol. Chem.*, **241**, 7059-7065 (1976).
- 9) A. L. Drachev, L. A. Drachev, A. D. Kaulen and L. V. Khitrina, *Eur. J. Biochem.*, **138**, 349-356 (1984).
- 10) S. P. Balashov, R. Govindjee, E. S. Imasheva, S. Misra, T. G. Ebrey, Y. Feng, R. K. Crouch and D. R. Menick, *Biochemistry*, **34**, 8820-8834 (1996).
- 11) H. -T. Richter, L. S. Brown, R. Needleman and J. K. Lanyi, *Biochemistry*, **35**, 4054-4062 (1996).

第5章

バクテリオロドプシンの配向制御 固定化と光電流応答

5.1. 緒言

前章までbRの固定化法はキャスト法であり、その分子配向はランダムであると考えられる。実際、小山らはbRのN末端、C末端をそれぞれ認識する抗体を作製し、電子顕微鏡観察により抗体ラベリングでbRのLB膜の配向を調べたところ、細胞膜外側が基板に向いた配向をとるbRと細胞膜内側が基板に向いた配向をとるbRがほぼ半分ずつ存在することを示した⁹⁾。すなわち、コインをばらまいたときに表と裏になるものがほぼ半分ずつ存在するように、bR固定化の際に特別な工夫をしなければその配向はランダムとなる。bRのプロトン輸送は細胞膜内側から外側という方向性を持っている。そのため、配向制御はbR固定化電極の高機能化、高感度化に対して重要であると考えられる。

bRは、懸濁液のpHが中性の場合にはプロトン取り込み側（細胞内側）がプロトン放出側（細胞外側）よりも負に帯電する⁹⁾。それに対して懸濁液のpHが酸性になると荷電状態が逆になり、プロトン放出側がより負に帯電する。従来のbRの配向制御固定化のほとんどが、このようなbRを含む紫膜の表裏の電荷分布の差を利用してきた。例えば、電着法¹⁰⁾では、2枚の電極の間にbR懸濁液を挿入し電場印加を行うことによって負極側に配向を制御した厚い膜が形成する。また、ポリアクリルアミドゲル中にbRを封入し、その両端に電場を印加する方法で配向膜が調製できる¹¹⁾。また、あらかじめ基板表面をポリカチオンで被覆し、その上にbR懸濁液を展開することによって配向制御bR単分子膜を作製されている^{10,12)}。

Fisherらは基板をポリリジンで被覆することにより、その上に展開するbR懸濁液のpHを変化させることによって、プロトン放出側、プロトン取り込み側がそれぞれ電極に向いたbR単分子膜を作製し、その評価を電子顕微鏡観察で行った¹⁰⁾。電子顕微鏡による紫膜の裏表の識別はbR発見当時から行われており、処理方法によってどのような形態に見えるかは明らかにされている。この研究では、pH7のbR懸濁液をポリリジン被覆ガラスに展開して得られた膜を空気乾燥、窒素乾燥、フェリチンラベリング、フリーズエッチング法によって処理し、電

子顕微鏡観察を行った。4通りの方法での観察の結果、いずれも80-95%の高い割合でプロトン取り込み側が基板を向いた配向をとっていることが明らかになった。

このポリリジンを用いたbR配向制御固定化は、レチナールの膜内での位置を決定する場合のbR配向制御単分子膜の作製に広く用いられてきた¹²⁻¹⁵⁾。bR分子内のレチナールを還元し蛍光性誘導体にした紫膜から基板へのエネルギー移動によってその位置が見積もられる。しかし、この場合では配向制御固定化が重要になってくるが、その固定化法としてポリリジンを利用したFisherの方法¹²⁾が用いられた。そのような研究のなかで大友らは、独自にパバインを用いてbR配向制御単分子膜の配向評価を行った¹⁵⁾。パバインはbRのカルボキシル末端(プロトン取り込み側)の17残基を特異的に切断することが知られている¹⁶⁾。プロトン取り込み側およびプロトン放出側が基板を向いているbR配向膜をパバイン処理したところ、プロトン取り込み側が基板を向いているbR単分子膜はカルボキシル末端がほとんど切断されなかったが、プロトン放出側が基板を向いているbR単分子膜の大半がカルボキシル末端を切断された。このことから、Fisherの方法によってbRの配向が高い割合で制御されていることがわかる。

さらにごく最近、Heらはポリカチオンとしてポリジメチルジアリルアンモニウムを用いて作製したbR積層膜をSHG (second harmonic generation) により測定したところ、電着法によって作製された膜より高い配向を取っていることを報告している¹⁷⁾。このように、ポリカチオンを利用したbRの配向制御固定化はbR研究では認められ広く使用されてきた。

本章では、配向制御固定化とその配向評価がすでに確立されている、ポリリジンによる静電的相互作用を利用したbR配向膜の光電流応答を調べ、bRの分子配向が光電流応答に与える影響を検討した。

5.2. 実験方法

ポリリジンを介したbR配向制御単分子膜の作製は過去の報告にしたがって行った¹¹⁾。前章までと同様に熱メタノール、熱濃硫酸で処理した SnO_2 電極に、5 mMポリ-L-リジン水溶液を $10 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ となるよう展開し1分間放置した後、純水でよく洗浄し窒素ガスで乾燥させた。 SnO_2 電極表面は負に帯電しているのでポリリジンは電極に静電的に強く吸着する。このように作製したポリリジンコート電極に、吸収極大での吸光度が2になるよう10 mMクエン酸バッファー (pH=4)、または10 mMリン酸バッファー (pH=7) に懸濁させた紫膜を $10 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ となるよう展開し1分間放置した後、超音波洗浄も含めて純水で洗浄することにより余分なbRを洗い流し、窒素ガスで乾燥させた。

光電流の測定方法は前章までと同様である。電解質溶液には5 mM HEPESを含む0.1 M Na_2SO_4 溶液 (pH=7.4) を用いた。ノイズを除去するため、ローパスフィルター (NE回路、E-3201B) を使用した。

5.3. 結果

bR単分子膜の電子顕微鏡観察

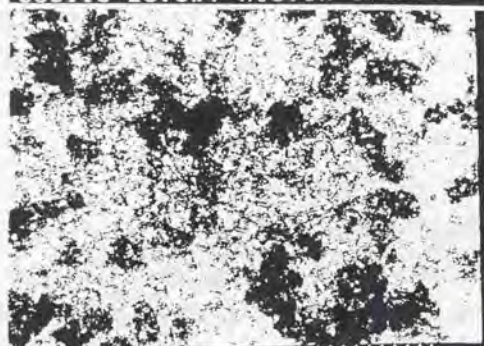
作製したbR（正確には紫膜）単分子膜（A, B）およびbRを被覆していない SnO_2 電極（C）を電子顕微鏡（SEM）で観察した結果をFig. 5-1に示す。bR単分子膜では黒い影がまばらにひろがっているのがわかる。それに対して SnO_2 電極では、そのような黒い影は見あたらなかった。したがって、黒い部分が紫膜の断片であることが推測される。実際にキャスト法で固定したbR膜を電子顕微鏡で観察すると、紫膜で覆われた部分はFig. 5-1のように黒く見え、 SnO_2 電極部分と明確に違うことから、この推測は妥当であるといえる。

Fig. 5-1から明らかなように、単分子膜といってもアルカンチオール自己組織化膜のように密にパッキングしているわけではなく、紫膜断片が島状に分布している。この状態は過去の報告^{10,11)}と一致する。また、ポリリジンコート電極上に展開するbR懸濁液のpHが異なることによって、電極上の紫膜の量に違いが見られた。すなわち、懸濁液のpHが7の場合は、4の場合よりも紫膜が多く存在する傾向があった。これは、最近報告された懸濁液のpHによる紫膜被覆率の傾向¹²⁾と矛盾しない。本章では、懸濁液pHの違いによる紫膜の被覆率については詳細な検討を行っておらず、今後の課題としたい。

(A)



(B)



(C)

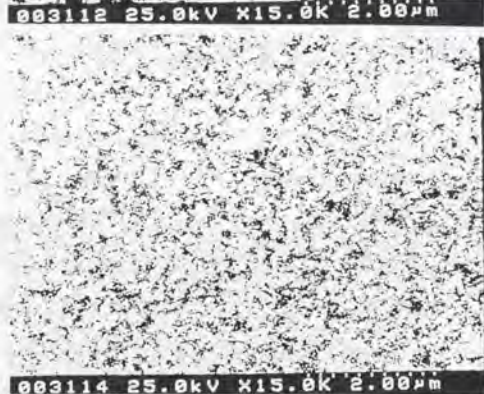


Fig. 5-1 SEM images of monolayer of purple membrane (PM).
(A) The pH of PM suspension: 4. (B) The pH of PM suspension:
7. (C) SnO_2 electrode.

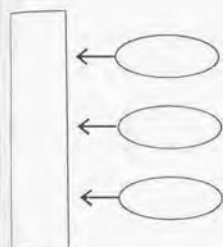
bR配向制御単分子膜の光電流応答

Fig. 5-2に配向を制御したbR単分子膜の光電流応答を示す。どちらの配向をとっていても、光照射の瞬間にはカソード方向に一過性の光電流が、光照射をやめた瞬間にはアノード方向に一過性の光電流が発生した。bRの分子配向にかかわらず光電流の極性が同じであることは、発生する光電流がbR分子内部の電荷移動に由来するものではないことを示している。もし、bR分子内部の電荷移動によって光電流が発生しているとすれば、bRの分子配向が反転すると光電流の極性も逆転するからである。それに対して、2章で提案したように光電流がbRのプロトン放出・取り込みに依存した電極近傍のpH変化に由来するならば、配向のいかんにかかわらず、光照射の瞬間にまず電極近傍の空間にプロトンが放出されるためpHが低下し、カソードの一過性光電流を発生する。光照射をやめた瞬間も同様に、配向に関係なくアノード光電流を発生する。したがって、この結果は2章で提案したメカニズムを支持する結果であるといえる。

光電流の大きさは、プロトン放出側が電極に向いたbR単分子膜からのほうがプロトン取り込み側が電極を向いた場合より大きくなった。これは、抗体でbRの配向を制御した単分子膜ではプロトン取り込み側を電極に向けたほうが光電流強度が大きくなった結果¹⁰⁾とは反対になった。本論文の結果と過去の報告の比較は考察で述べる。

Fig. 5-3にプロトン放出側が電極に向いた単分子膜からのLight-on光電流の作用スペクトルを示す。作用スペクトルは、溶液中のbRの吸収スペクトルとほぼ一致した。本研究室の紫外・可視分光光度計（日本分光、Ubest-50）ではbR単分子膜の吸収スペクトルは観測できなかったが、この結果からbRが確かに固定されており光電流応答発生の原因となっていることが示された。光電気化学的方法が分光法より感度良く電極表面の吸着種の同定を行える場合もあるが、この結果もそのような例であると考えられる。

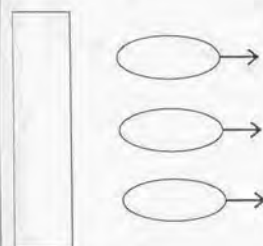
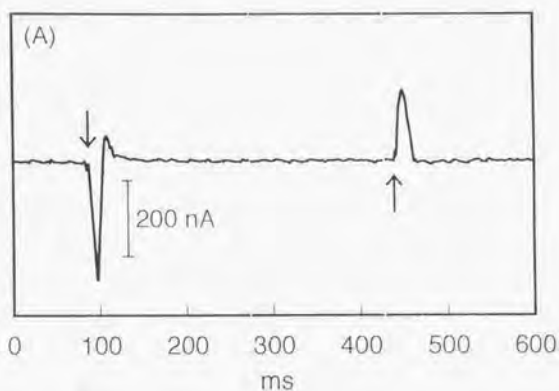
Orientation



SnO₂

bR

Photocurrent pattern



SnO₂

bR

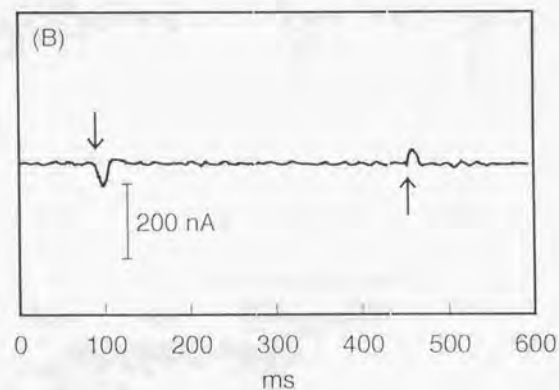


Fig. 5-2 Photocurrent response patterns from bR oriented monolayers.
The pH of bR suspensions: (A) 4, (B) 7. Electrode potential, 0.0 V vs. Ag/AgCl.

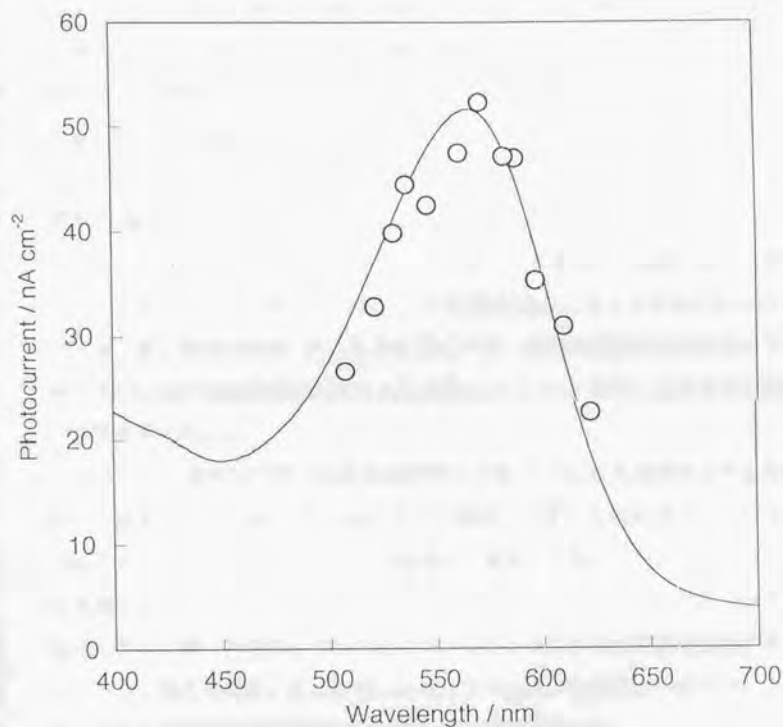


Fig. 5-3 Action spectrum of the peak photocurrent from bR monolayer with an extracellular side facing the electrode. Incident monochromatic photon flux, $3.23 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. The solid curve represents the absorption spectrum of bR in suspension.

ポリリジンによる電極被覆の影響

また、ポリリジンで電極を被覆した影響を調べるため、bRの配向がそろっていない擬単分子膜をキャスト法で作製し、光電流応答の比較を試みた。bR単分子膜の吸収極大での吸光度は、宮坂のLB法によるbR積層膜の傾き $0.0017 / \text{monolayer}^{20)}$ とHeらのポリカチオンを用いたbR積層膜の傾き $0.0015 / \text{monolayer}^{21)}$ を参考にして、 0.0015 とした。bRの吸光係数 $\varepsilon = 63000$ を用いて、この値から電極表面のbR密度、 $2.3 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ を求め、これとbR量が等しくなる量を、吸収極大での吸光度が 0.029 のbR懸濁液 $50 \mu\text{L/cm}^2$ と計算した。bR分子の表面密度から、bR単分子膜の分子専有面積は約 $700 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ と見積もられた。bRは紫膜中で3量体を基本構造とした2次元結晶を形成していることを考えると、bR単分子膜とはいっても密にパッキングしたイメージではなく、紫膜が島状に電極の上に分布していると考えられる。この状態はLB法によって作製されたbR単分子膜の電子顕微鏡観察²²⁾からも示されている。実際の測定では吸収極大での吸光度が 0.038 のbR懸濁液 $50 \mu\text{L}$ を SnO_2 電極上 $1 \times 1 \text{ cm}$ に展開し乾燥させた擬単分子膜を用いた。

bRキャスト擬単分子膜とbR配向制御単分子膜のLight-on光電流の大きさを比較した結果をFig. 5-4に示す。bRキャスト擬単分子膜の光電流強度はどちらのbR配向膜よりも大きくなった。この結果は、電極を被覆しているポリリジンが応答感度を低下させている可能性を示している。2章で述べたように、bRの光電流応答には酸化物電極表面の水酸基のプロトン解離平衡が重要な役割を果たしていると考えられる。正に荷電したポリリジンは、電極表面へのプロトン拡散と吸着を静電的かつ物理的に阻害することが示唆される。

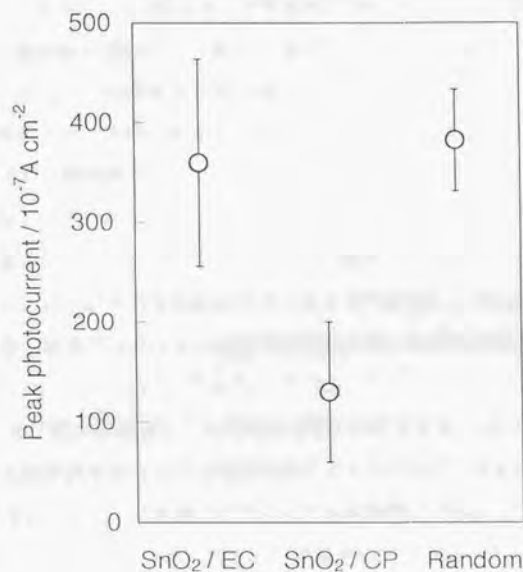


Fig. 5-4 Comparison of the peak photocurrent at light-on from bR monolayers. SnO₂ / EC (n=5): bR monolayers with an extracellular side facing the electrode. SnO₂ / CP (n=5): bR monolayers with a cytoplasmic side facing the electrode. Random (n=3): bR monolayer with random orientation.

5.4. 考察

配向を制御したbR単分子膜の光電流応答は、極性はbRの分子配向に関係しなかったが、大きさは配向によって変化した。

得られた結果を、過去の電極-溶液界面のbR配向膜の光電流応答の報告と比較した。これまで、2つのグループが電極-溶液界面のbRの光電流応答をbRの分子配向の観点から検討している^(18,20)。報告されている光電流応答のパターンをFig. 5-5に示し、その結果を本章で得られた結果とあわせてTable 5-1にまとめた。過去の報告でも、本章の結果と同様に発生する一過性光電流の極性はbRの配向に依存せず、電解質溶液が中性の場合には光照射の瞬間にカソード方向に一過性の電流が、光照射をやめた瞬間にはアノード方向に一過性の光電流が発生した。光電流の大きさに関しては、小山らの報告⁽¹⁸⁾ではプロトン取り込み側が電極を向いたほうが光電流強度が大きくなったのに対し、Wangらの結果⁽²⁰⁾、ならびに本章の結果ではプロトン放出側が電極に向いたほうが光電流強度が大きくなった。

bRの分子配向が逆転しても光電流応答の極性が逆転しないことは、これまで多くの研究例がある分子内電荷移動による光電応答（無配向膜では応答は観測されない、もしくは観測されたとしても配向膜の2桁以上小さい応答になる）ではないことを示し、2章で提案した光電流発生メカニズムを支持する。

bRの配向を揃えることにより光電流強度が増加し、配向制御固定化がbR固定化電極の高感度化に寄与することが示された。しかし、本論文とWangらの結果ではプロトン放出側が電極に向いているほうが光電流強度が大きくなるのに対し、小山らの結果ではプロトン取り込み側が電極に向いているほうが光電流強度が大きくなった。これに関しては固定化法が異なるため単純な比較は今のところできない。また、電極表面を修飾することによる電気二重層の変化（特に本章のようなカチオン性ポリマーで被覆した場合）も光電流強度に影響を与えることが考えられる。今後、このような影響の理解も含めて、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。

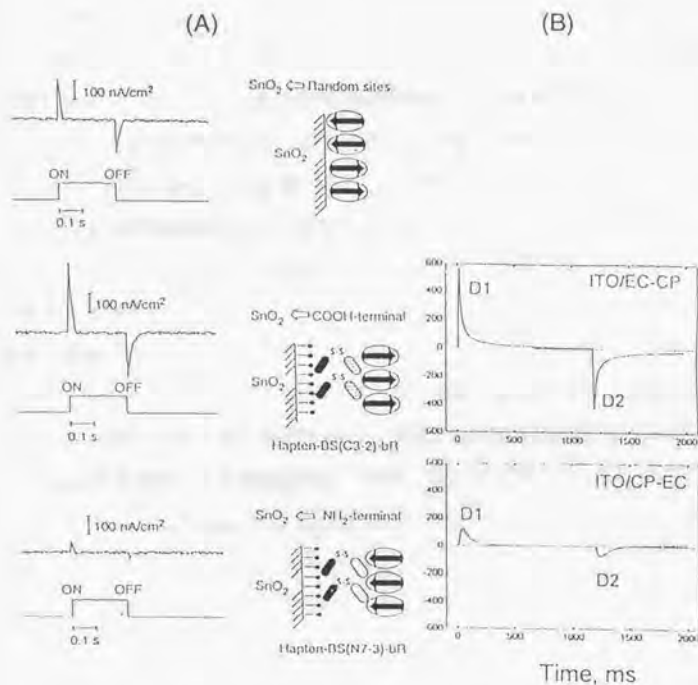


Fig. 5-5 photocurrent response patterns from bR oriented membranes reported Koyama et al. (A)¹⁸⁾ and Wang et al. (B).²⁰⁾

Table 5-1 Comparison of the photocurrent response patterns from bR oriented membranes.

Method	Polarity	Intensity
Koyama et al. 抗体を利用した単分子膜	配向に関係せず*	取り込み側・電極が大
Wang et al. 電着法 (厚い膜)	配向に関係せず*	放出側・電極が大
本章の結果 ポリカチオンを利用した単分子膜	配向に関係せず*	放出側・電極が大

ポリリジンを使用せずキャスト法によって作製した擬単分子膜の光電流応答は、配向膜で大きな応答が得られる場合よりもさらに大きくなる傾向がみられた。光電流発生が2章で提案したメカニズムに従えば、ポリリジンによる電極被覆が電極とプロトンとの相互作用を物理的または静電的に阻害することは予想できる。小山らの報告では、リン脂質による電極被覆の影響について検討をおこなっていないが、この影響については再考慮されるべきかもしれない。

bR分子の配向制御固定化がbR固定化電極の高感度化に大きく寄与することが示された。しかし同時に、固定化する際の電極の表面修飾が逆に光電流応答の感度を低減する可能性があることも同時に示された。これらの結果から、bR固定化電極の高感度化の設計指針が得られた。すなわち、理想的に高感度化をはかるには、bRの分子配向を制御して、かつ電極表面のプロトン拡散を阻害しないような電極界面の設計が望まれる。今後、bRの配向制御固定化に対するさらなる研究が進むことを期待する。

参考文献

- 1) N. Yamaguchi, Y. Jinbo, M. Arai and K. Koyama, *FEBS Lett.*, **324**, 287-292 (1993).
- 2) R. Jonas, Y. Koutalos and T. G. Ebrey, *Photochem. Photobiol.*, **52**, 1163-1177 (1990).
- 3) K. Nagy, *Biochem. Biophys. Chem. Commun.*, **85**, 383-390 (1978).
- 4) G. Varo and L. Keszthelyi, *Biophys. J.*, **43**, 47-51 (1983).
- 5) G. I. Groma, G. Szabo and G. Varo, *Nature*, **308**, 557-558 (1984).
- 6) A. A. Kononenko, E. P. Lukashev, A. V. Maximychev, S. K. Chamorovsky, A. B. Lubin, S. F. Timashev and L. N. Chekulaeva, *Biochim. Biophys. Acta*, **850**, 162-169 (1986).
- 7) S. Y. Liu and T. G. Ebrey, *Biophys. J.*, **54**, 321-329 (1988).
- 8) S. Y. Liu, *Biophys. J.*, **57**, 943-950 (1990).
- 9) S. Misra, *Biophys. J.*, **75**, 382-388 (1998).
- 10) K. A. Fisher, K. Yanagimoto and W. Stoeckenius, *J. Cell Biol.*, **77**, 611-622 (1978).
- 11) K. A. Fisher, *Methods Enzymol.*, **88**, 230-235 (1982).
- 12) T. Kouyama, Y. Kimura, K. Kinoshita, Jr. and A. Ikegami, *J. Mol. Biol.*, **153**, 337-359 (1981).
- 13) T. Kouyama, K. Kinoshita, Jr. and A. Ikegami, *J. Mol. Biol.*, **165**, 91-107 (1983).
- 14) T. Kometani, K. Kinoshita, Jr., T. Furuno, T. Kouyama and A. Ikegami, *Biophys. J.*, **52**, 509-517 (1987).
- 15) J. Otomo, A. Tomioka, K. Kinoshita, Jr., H. Miyata, Y. Takenaka, T. Kouyama, and A. Ikegami, *Biophys. J.*, **54**, 57-64 (1988).
- 16) R. Renthal, G. J. Harris and R. Parrish, *Biochim. Biophys. Acta*, **547**, 258-269 (1979).
- 17) J. -A. He, L. Samuelson, L. Li, J. Kumar, and S. K. Tripathy, *Langumir*, **14**, 1674-1679 (1998).
- 18) K. Koyama, N. Yamaguchi and T. Miyasaka, *Science*, **265**, 762-765 (1994).

19) 宮坂 力, 電子写真, **31**, 578-584 (1992).

20) J. -P. Wang, S. -K. Yoo, L. Song, M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B*, **101**, 3420-3423 (1997).

第6章

ハロロドプシン固定化電極の 光電流応答

6.1. 緒言

前章までbRの光電流応答を検討し、観測される光電流応答がbRのプロトン放出・取り込みに依存した電極近傍のpHに由来することを明らかにするとともに、この光電流応答がbRのプロトン輸送に関する有用な情報を与えうることを示した。

hRは高度好塩菌の細胞膜に存在するもうひとつのイオンポンプであり、光を吸収することにより塩化物イオンを細胞膜外側から内側に輸送する機能を持つ¹²⁾。hRはbRと構造上の共通点や類似点が多く、イオン輸送機構も共通である可能性が示唆されている。実際に、bRの85番目のアスパラギン酸 (Asp-85) をhRと同様に非解離性のトレオニンに置換した変異bRは塩化物イオンを輸送し、この可能性を支持する¹³⁾。

プロトンポンプであるbRがアミノ酸を1個変えただけで塩化物イオンを輸送するのに対して、塩化物イオンを輸送するhRがアジドイオン存在下でプロトンを輸送することが最近報告されている¹⁴⁾。アジドイオンがレチナールシッフ塩基のプロトンドナーやアクセプターとなり得ることは、96番目のアスパラギン酸 (Asp-96) を置換したbR変異体などで報告が行われている¹⁵⁾。hRでも、アジドイオンがチャネル内でプロトン輸送を担っていると考えられる。

Fig. 6-1にbRとhRのプロトン輸送メカニズムの模式図を示す。bRではレチナールの上下に85番目のアスパラギン酸 (Asp-85) と96番目のアスパラギン酸 (Asp-96) が位置し、それぞれシッフ塩基からのプロトンアクセプター、シッフ塩基へのプロトンドナーとして機能している。これらのアミノ酸を含めた水素結合ネットワークがプロトン輸送には必須である。しかし、hRには輸送経路にシッフ塩基からプロトンを受け取る、または受け渡す役割の酸性アミノ酸が存在しない。そのため、hRではシッフ塩基のプロトンが光反応過程で解離せず、プロトン輸送も起こらない。しかし、アジドイオンが存在すると、輸送経路でAsp-85とAsp-96の役割を演じると考えられ、その結果としてhRもプロトンを輸送する。

Mechanism of Proton Transport

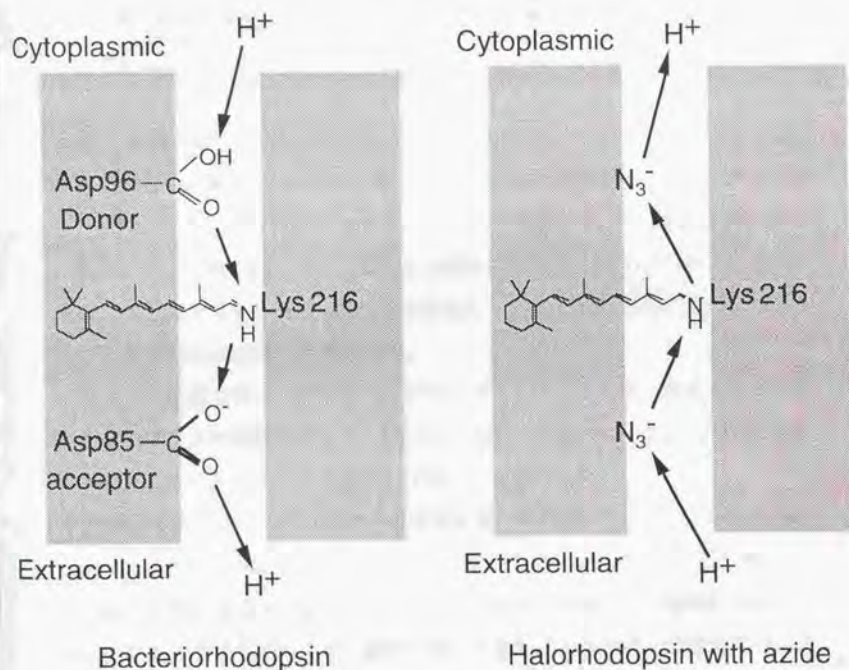


Fig. 6-1 Proton transport mechanism of bacteriorhodopsin and Halorhodopsin with azide.

このようにhRがプロトン輸送を行うとすれば、本論文で提案している光電流発生機構に従って、新たにhRからもbRと同様の光電流応答が観測できることが期待される。これは、本論文で解析している光電気化学的方法の適用がbRのみに限定されるのではなく、他のタンパク質のプロトン輸送に関する研究に応用できる可能性を探る意味でも重要である。本章では、電解質溶液にアジドイオンを共存させることにより、hRからの光電流応答を観測することを試みた。

6.2. 実験方法

H. salinarium 由来のhR (shR) は北海道大学加茂研究室から提供していただき、使用前まで塩濃度の高い溶液中に懸濁させ冷蔵保存した。使用直前に純水に懸濁させ、35000 rpm、4℃、30分間の超遠心操作を2回行い、hRを洗浄してから、吸収極大での吸光度が約1.5になるよう純水に懸濁させ、その50 μ LをSnO₂電極上1×1 cmに広げ乾燥させた。

光電流の測定方法は、前章までと同様である。アジドイオン濃度依存性を調べるときは、支持電解質として1 MのNa₂SO₄を、バッファーとしてHEPESを用い、必要に応じてアジ化ナトリウム (NaN₃) を添加した。

光電流応答に対するバッファーの影響を調べるため、2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES) / NaOH、2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris) / HCl、KH₂PO₄ (Phosphate) / NaOH を用いた。電解質溶液のpHを一定に保ちながらバッファー濃度を変化させた。このとき、電解質溶液には0.5 MのNaN₃を含む1 MのNa₂SO₄溶液を用いた。

6.3. 結果

hRの光電流応答

電解質溶液にアジ化ナトリウムが存在しない場合は、光照射を行っても応答は観測することができなかった。また、アジ化ナトリウムが存在せずに塩化物イオンが存在しても (NaClを添加)、光電流応答は観測できなかった。すなわち、通常の条件でhRが行う塩化物イオンの輸送によっては、光電流が発生しない。これは、 SnO_2 電極が塩化物イオンに対して応答性を持たないからだと考えられる。

一方、電解質溶液にアジドイオン (N_3^-) が存在すると、光照射によって応答を観測することができた。Fig. 6-2にアジドイオン存在下でのhRの光電流応答を示す。応答パターンは、bRと同様に光照射の瞬間にカソード方向に一過性の電流が観測された。また、光照射をやめた瞬間にはアノード方向に一過性の光電流が発生したが、その強度は小さくLight-on光電流に対するLight-off光電流の比は0.2-0.3程度であった。これは、アルカリ性でのbRの光電流応答のように、プロトン取り込み速度が遅いことに由来すると考えられる。これは、アジド存在下でのhRの410 nmの吸収変化では、その減衰 (シッフ塩基の再プロトン化に相当) は数10 msのオーダーであることによって支持される。

hR光電流応答のアジド濃度依存性

Fig. 6-3にhRからの光電流応答の大きさのアジド濃度依存性を示す。アジドイオンの増加に従って光電流強度は増大し、0.5 M程度で飽和する傾向が見られた。光電流強度がhRのプロトン輸送に必要なアジドイオン濃度に依存することは、観測している光電流応答がhRのプロトン輸送による電極近傍のpH変化に由来することを示している。

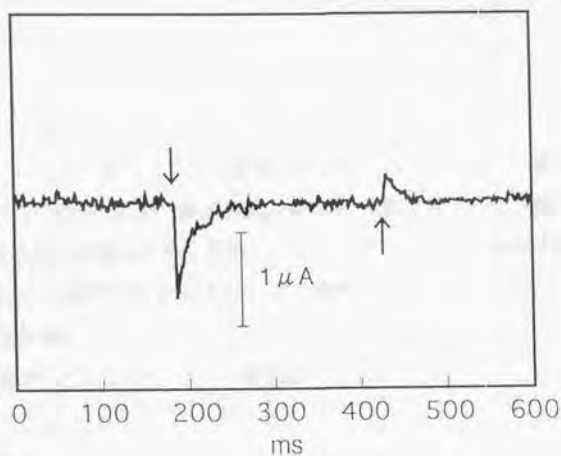


Fig. 6-2 Photocurrent response pattern from hR on SnO_2 electrode. The arrows denote turning on and off of the incident light. Light intensity, $1.3 \times 10^2 \text{ mW cm}^{-2}$. Electrolyte, 1 M Na_2SO_4 with 0.5 M NaN_3 .

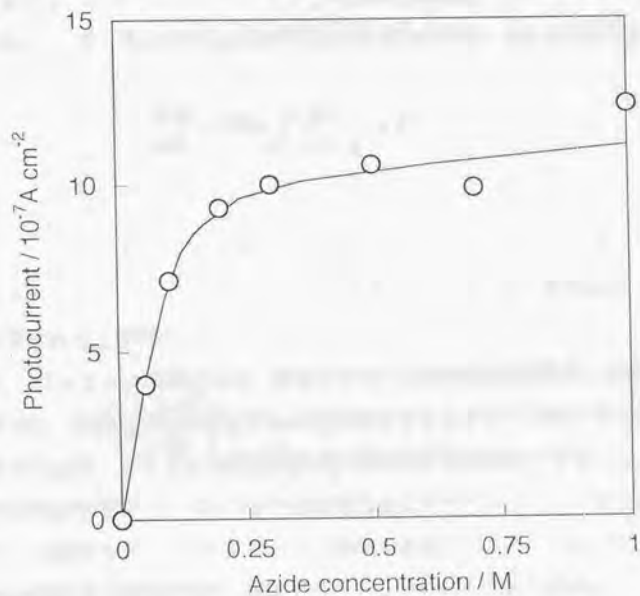


Fig. 6-3 Dependence of the photocurrent by turning on of light on azide concentration. Electrode potential, 0.0 V vs. Ag/AgCl . Electrolyte, 1 M Na_2SO_4 with 1 mM HEPES buffer ($\text{pH}=7.5$).

hR光電流応答に対するバッファーの影響

Fig. 6-4に光を照射した瞬間のhRの光電流応答の大きさのバッファー濃度依存性を示す。hRの光電流応答は、bRの光電流応答と同様にバッファー濃度の増加に伴い減少する傾向が見られた。これは、2.2で述べたように溶液の緩衝能の増加にしたがってhRのプロトン放出による電極近傍のpH変化が抑えられる結果であると考えられる。

光電流強度の逆数(1/I)のバッファー濃度依存性をFig. 6-5に示す。用いた3種類のバッファーで、1/Iはバッファー濃度に対して直線関係にあり、2.2で述べたように緩衝能がバッファー濃度に比例する結果である。しかし、bRの場合とは異なり原点を通らない。これは、電解質溶液中に0.5 M存在するアジドイオンがバッファーとしての役割を果たしている可能性を示唆する。すなわち、溶液の緩衝能が次式のようにバッファーの緩衝能と溶液(主にアジドイオン)の緩衝能 β_{sol} の足し合わせになるためであると考えられる。Fig. 6-5の切片がpH

$$\frac{d[B]}{dpH} = 2.303 \frac{cK'_a[H^+]}{(K'_a + [H^+])^2} + \beta_{sol} \quad (6-1)$$

の低下(アジドイオンの pK'_a である4.7に近づく)によって小さくなることも、バッファーとして機能する化学種の pK'_a と溶液のpHが近いほど緩衝能が大きくなる結果であると解釈することもできる。

また、バッファー濃度が小さい範囲の挙動もbRの場合と異なる。bRの光電流応答では、溶液に少量のバッファーを存在させるとプロトンのバルク拡散が促進されるため、バッファー濃度が小さい範囲で光電流強度が増加した。本章のhRの光電流応答では、バッファーが存在しなくてもアジドイオンが少量のバッファーの役割を演じプロトンのバルク拡散を促進するため、バッファー濃度が小さい範囲での光電流強度の増加がみられなかったと考えられる。

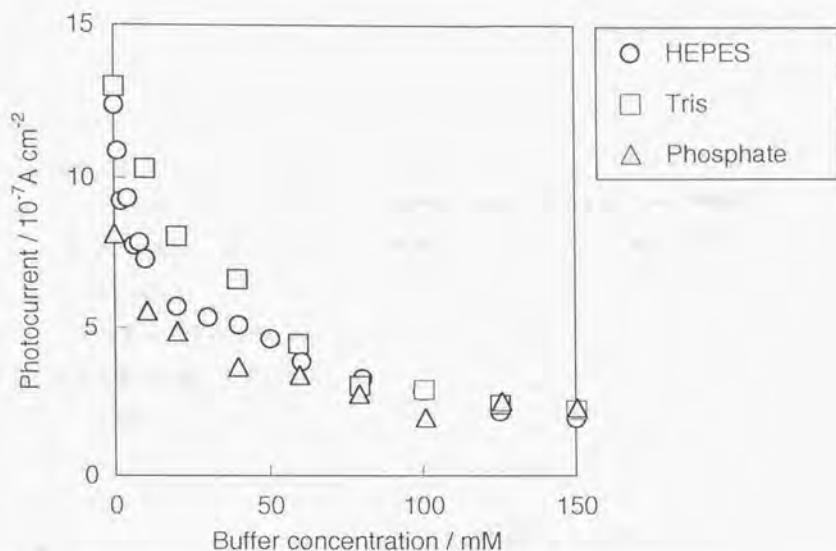


Fig. 6-4 Dependence of light-on photocurrent from hr-SnO₂ with azide on buffer concentration for HEPES (pH=7.5), Tris (pH=8.1) and phosphate (pH=7.0) buffers.

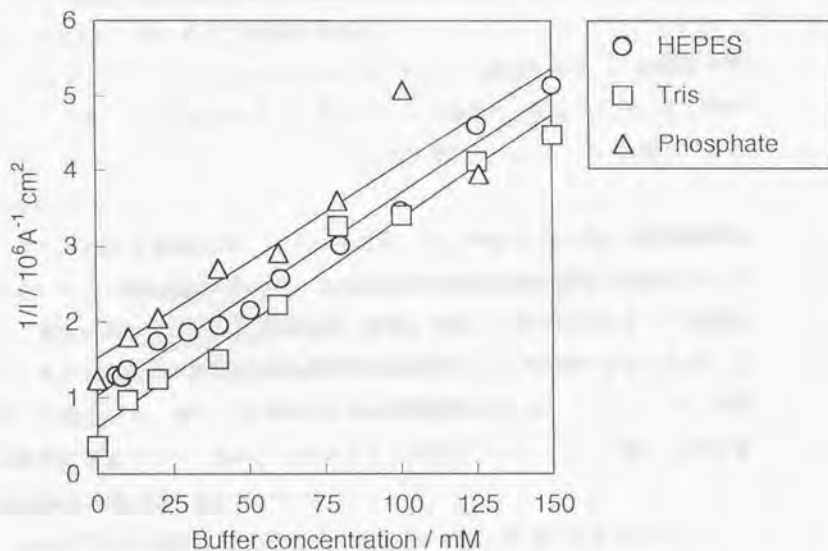


Fig. 6-5 Reciprocal of photocurrent intensity as a function of buffer concentration for HEPES, Tris and phosphate buffers.

6.4. 考察

hR単独では光電流応答を観測することはできなかったが、アジドイオン(N_3^-)が共存することによりbRと同様に光照射の瞬間と光照射をやめた瞬間にのみ一過性の光電流が発生した。この光電流応答はアジドイオン濃度の増加とともに大きくなった。

アジドイオンが存在しないときに一過性の光電流応答が発生しないことから、まず光電流応答の発生源がレチナールタンパク質分子内部の電荷移動ではないことが裏付けられる。もし、一過性の光電流が、(bRの、あるいはアジドイオン存在下のhRの)プロトン放出・取り込みによる電極近傍のpH変化によるものではなく、分子内部の電荷移動に由来するのであれば、プロトンではなく塩化物イオンを輸送するhRからも光電流応答が観測されるはずである。実際、パルス光励起によってhRからも分子内部の電荷移動に由来する光電応答は観測されている。したがって、本論文で観測している微分型光電流応答はこれまで述べてきたように分子内部の電荷移動に由来するものではなく、そのような応答とは区別して考えることが必要である。

hRはアジドイオン存在下でbRのようにプロトン輸送を行うことが報告されている。hRからの光電流応答は、そのプロトン輸送に必要なアジドイオン濃度に依存することから、hRとアジドイオンの協同作用によるプロトン輸送であることが示された。

また、hRの光電流応答は、bRの光電流応答と同様にバッファー濃度の増加に従い小さくなる傾向がみられ、光電流強度の逆数はbRの場合と同様にバッファー濃度に対して直線関係を示した。このことは、2章で示したように観測している光電流応答が電極近傍のpH変化に由来することの直接的証拠となる。これらの結果から、新たに観測されたhRの光電流応答はhRとアジドイオンの協同作用によるプロトン輸送に由来することが明らかになった。今後、この応答の特性を詳細に調べる必要がある。

hRのプロトン輸送に由来する光電流応答が新たに観測できたことによって、

bRよりも研究が遅れているhRのプロトン輸送機構に迫る手段として大きな威力を発揮することが期待される。それとともに、本論文で示した光電気化学的方法がbRに限定されるものではなく、ほかのタンパク質のプロトン輸送の研究手段として用いることができる可能性が示された。

参考文献

- 1) B. Schobert and J. K. Lanyi, *J. Biol. Chem.*, **257**, 10306-10313 (1982).
- 2) J. K. Lanyi, *Physiol. Review*, **70**, 319-330.
- 3) J. Sasaki, L. S. Brown, Y. -S. Chon, H. Kandori, A. Maeda, R. Needleman and J. K. Lanyi, *Science*, **269**, 73-75 (1995).
- 4) E. Bamberg, J. Tittor and D. Oesterhelt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 639-643 (1993).
- 5) G. Varo, L. S. Brown, R. Needleman and J. K. Lanyi, *Biochemistry*, **35**, 6604-6611 (1996).
- 6) J. Tittor, C. Soell, D. Oesterhelt, H. -T. butt and E. Bamberg, *EMBO J.*, **8**, 3477-3482 (1989).
- 7) Y. Cao, G. Varo, M. Chang, B. Ni, R. Needleman and J. K. Lanyi, *Biochemistry*, **30**, 10972-10979 (1991).
- 8) J. Tittor, M. Wahl, U. Schweiger and D. Oesterhelt, *Biocim. Biophys. Acta*, **1187**, 191-197 (1994).

第7章

総括

高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* のレチナールタンパク質であるバクテリオロドプシン (bR) とハロロドプシン (hR) の光電気化学特性はタンパク質の動的挙動や光デバイス応用の観点から多くの興味を集めているが、その光電応答のメカニズムは明らかではない。本論文は、レチナールタンパク質の光電流発生機構の解明とそれに基づいた光電流応答の利用を目的とし、物理化学的にその光電気化学特性を解析した。

第1章は序論で、研究の背景と目的を述べた。bR、hRの基本特性と光電応答に関する研究を概観したのち、光電流応答の発生機構が明確でなく、その解明には物理化学的なアプローチが必要であることを主張した。

第2章では、bRの光電流応答の発生機構について検討した。第1節では、従来bRの固定化に使用されてきた酸化物電極の代わりに金電極を用い、その電位を制御することによりpH変化に応答する電極表面の酸化被膜量を厳密に制御し、bRの光電流応答との対応を調べた。その結果、光電流応答は金電極表面の酸化被膜形成とともに増加し、bR分子のプロトン放出・取り込みに依存した電極近傍のpH変化に由来することを新たに示した。

第2節ではbRの光電流応答に対するバッファの影響を検討した。バッファ濃度依存性、バッファ存在下でのpH依存性から、緩衝能の増加によって光電流強度は小さくなることを明らかにし、その結果を詳細に解析することにより発生する光電流の大きさはpH変化量と直接対応することを示した。また、従来の報告で光電流応答がbRのプロトンポンプ活性と必ずしも対応しない理由として、バッファが大きな要因を占めていることを新たに示した。

第3章では、bRの光電流応答のpH依存性を検討し、bRの光反応サイクルとの対応を明らかにした。酸性でその極性が逆転し、アルカリ性では光照射をやめた瞬間の光電流が著しく小さくなる特徴的な光電流応答がbRの光反応サイクルでのプロトン放出・取り込みの過程から解釈できることを示すとともに、光電流応答がbRのプロトンポンプ活性に関する有用な情報を与えることを示した。また、本論文で研究を進めている光電気化学的方法が新しいプロトンポン

ブ活性測定法となる可能性を提案した。

第4章では、bRに結合している金属イオンの役割を解明するために、前章の解析結果をもとに金属イオン交換bRの光電流応答のpH依存性について検討した。光電流応答が逆転するpHは金属イオンの価数の増加にしたがって酸性側にシフトすることを明らかにした。この結果から、金属イオンがbR分子のプロトン放出口付近に存在するアミノ酸残基の解離定数を調節している可能性を新たに示した。また、アルカリ性での光電流応答の挙動から、ランタンイオンがbRのプロトン取り込み速度を遅くすることを光電気化学的に直接示した。

第5章では、bRを用いたデバイス作製で重要なポイントとなる配向制御固定化と光電流応答との関係を検討した。光電流応答の極性はbR分子の配向には依存せず、発生する光電流はbR分子内部の電荷移動過程に由来するものではないことを示した。また、配向制御がbRの光電流応答の高感度化に大きく寄与することを明らかにした。さらに、配向制御を行うための電極の表面修飾が光電流応答を抑えることが明らかになり、bR固定化電極の高感度化の指針が得られた。

第6章では、前章までに得られた知見に基づき、通常はクロライドポンプとして機能するハロロドプシン (hR) に対し、電解質溶液中にアジドイオンを存在させることにより、新たにhRの光電流応答を観測した。この応答は、hRのプロトン輸送を促進するアジドイオン濃度に依存して大きくなること、電解質溶液中のバッファー濃度の増加によって小さくなることから、アジドイオンの共存効果によるhRのプロトン輸送に由来することを明らかにした。これによって、本論文での光電気化学的方法論がbRのみに限定されるわけではないことを示した。

以上の結果から、電極-溶液界面のbRから発生する微分型光電流応答は、bRのプロトン放出・取り込みに依存した電極近傍のpH変化に由来し、従来の研究で推測されているbR分子内部の電荷移動による応答と明確に区別する必要がある。また、この光電気化学特性が、レチナールタンパク質のプロトン輸送に関

する有用な情報を与えうとの結論を得た。

今後の研究の方向性として、(1) パルス光励起で発生するシグナル成分の物理化学的または電気化学的方法による正確な同定、(2) 光電気化学的アプローチによるbRプロトンメカニズム解明、(3) bRのデバイス化への応用、が考えられる。以下に、これらについて簡単に述べる。

(1) パルス光励起で発生するシグナル成分の物理化学的または電気化学的方法による正確な同定

bR配向膜にパルス光を照射したときに発生するシグナルのうち、マイクロ秒成分(B2)とミリ秒成分(B3)の起源は明らかではない。B2は時定数としてはL→M中間体の過程に対応しており、主にシッフ塩基から85番目のアスパラギン酸(Asp-85)へのプロトン移動に由来すると考えられてきたが、近年、bR分子からのプロトン放出による電荷移動の関与も示唆されている。これら分子内の電荷移動と分子外へのプロトン放出の寄与を明確に区別する必要性は本論文でたびたび述べてきた。本論文、特に2章、3章で述べた手法をB2成分、B3成分に適用していくことにより、分子内電荷移動と分子外へのプロトン放出・取り込みの寄与を明確に分離できることが期待される。

(2) 光電気化学的アプローチによるbRプロトンメカニズム解明

本論文ではbRの光電流応答がbRのプロトンポンプ活性に関する有用な情報を与えることを示した。今後、bRの光電気化学的方法はリボソームを用いる方法、pH感受性色素を用いる方法と並び、bRのプロトンポンプ活性測定において重要な位置を占められると思われる。また、bR変異体や金属イオンを交換したbRの光電流応答を解析することによって、bRのプロトンポンプメカニズムにせまることが期待される。分光学との併用も大きな威力を発揮する可能性がある。

(3) bRのバイオデバイスへの応用

bRの光電気化学特性はデバイスへの応用を考えるうえで非常に興味深い。今後、bRを用いたデバイス設計で重要となるのは（配向制御）固定化と感度の向上であろう。

固定化法では、5章でも試みた配向制御とその評価が大きなポイントとなる。本論文で試みた静電的相互作用を利用した配向制御固定化の他にも、リンカーを利用した共有結合による固定化、自己組織化による固定化などの研究を進めるべきである。

高感度化を考える上では、まず電極材料の探索が必要となるだろう。2章でも示したとおり、酸化物電極は金属電極を用いる場合より感度の面で優れている。他の酸化物電極に対する研究も行うべきであろう。また、電極界面の分子設計による光応答の増幅、いわば「分子アンプ」の概念や他の情報への変換も興味深い。

分子デバイスとしての応用を考えると、究極的には単一bRからの応答を目指すことになるが、そのためには2次元結晶を形成している紫膜から脂質を取り除き、bR1分子を安定に固定化する方法を実現する必要がある。そのためにはナノポーラス界面の利用などが考えられる。

本論文は、bRの光電流応答を物理化学的に調べ、まとめた初めてのものである。今後、本論文を基にして、幅広く面白い研究に展開していくことを期待する。

Appendix

高度好塩菌の培養と バクテリオロドプシンの精製

高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* S-9 の培養とbRを含む紫膜の精製は、基本的にOesterheltとStoeckeniusの方法¹⁾に従って行った。高度好塩菌は、富士写真フィルムの小山氏、宮坂氏より頂いた。なお、理化学研究所微生物系統保存施設(JCM)には、ほとんどすべての高度好塩菌が保存されており、分譲を依頼することができる。

高度好塩菌の培養

培養液の組成

培養液 1 L の組成を以下に示す。

NaCl	250 g
KCl	2 g
MgSO ₄	20 g
CaCl ₂	0.2 g
Na ₃ Citrate	3 g
Oxoid Bacteriological Peptone	10 g

培養の手順は以下のとおりである。

- (1) 寒天培地のコロニーを10mlの培養液にいれ、39℃で5日間空気を通入する。
- (2) 培養液を300mlにして、39℃で約7日間空気を通入する。
- (3) 培養液を2Lにして、39℃で約7日間空気を通入する。
- (4) 39℃で3日間窒素を通入する。

高度好塩菌の分離と紫膜の精製

H. salinarum の集菌と紫膜の精製を以下のように行った。

- (1) 培養液を4℃で7000×g (7000rpm)、30分間遠心にかけ、集菌する。
- (2) 沈殿物をBasal Saltに懸濁させ、4℃で7000×g、30分間遠心を2回払い、集めた菌を洗浄する。
- (3) 沈殿物をBasal Saltに懸濁させDNase Iを加え、4℃で純水に対して1晩透析を行う。
- (4) 4℃で3000×g (3000rpm)、5分間遠心を行い、上澄みをとる。
- (5) 4℃で35000rpm、20分間超遠心を行う。
- (6) 沈殿物を純水に懸濁させ、上澄みが無色になるまで4℃で35000rpm、20分間超遠心を行い洗浄する。
- (7) 4℃で32000rpm、18時間ショ糖密度勾配遠心(30%、35%、40%、45%、50%、60%)を行い、Purple membrane (PM) とRed membraneを分離する。
- (8) PM画分をとり、4℃で純水に対して1晩透析を行う。
- (9) 4℃で35000rpm、20分間超遠心を行い、紫膜を集める。

ショ糖密度勾配遠心法によって、PM画分はショ糖濃度45%のところにバンドを作り、RM画分は35%のところにバンドを作った。ショ糖密度勾配遠心の行程は省いても、本研究では問題はなかった。

このようにして精製したbRの吸収スペクトルをFigureに示す。明順応状態では568nmに吸収極大をもつ ($\epsilon = 63000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。bRは膜タンパク質であるた

め、水に不溶である。この吸収スペクトルはバクテリオロドプシンが水に懸濁した状態である。

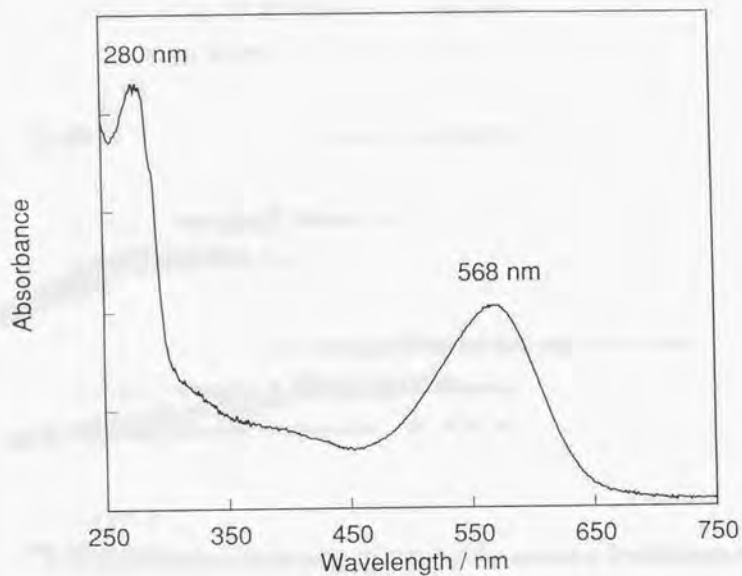


Figure Absorption spectrum of light-adapted bR suspension.

参考文献

- 1) D. Oesterhelt and W. Stoeckenius, *Methods Enzymol.*, **31**, 667-678 (1974).

発表論文リスト

審査論文

1. Mechanism of Photocurrent Generation from Bacteriorhodopsin on Gold Electrode

Y. Saga, T. Watanabe, K. Koyama, and T. Miyasaka

J. Phys. Chem. B, **103**, 234-238 (1999). (第2章第1節)

2. pH-Dependent Photocurrent Response from Bacteriorhodopsin at Electrode-Electrolyte Interface

Y. Saga, T. Watanabe, K. Koyama, and T. Miyasaka

Chem. Lett., 961-962 (1998). (第3章)

3. Buffer Effect on Photoelectrochemical Response from Bacteriorhodopsin

Y. Saga, T. Watanabe, K. Koyama, and T. Miyasaka

Anal. Sci., Accepted for publication. (第2章第2節)

In preparation

4. Effect of Metal Ion Exchange on Photocurrent Response from Bacteriorhodopsin

Y. Saga, T. Ishikawa, T. Watanabe, K. Koyama, and T. Miyasaka

(第4章)

5. Photocurrent Response from Bacteriorhodopsin Oriented Monolayers

Y. Saga, T. Irie, T. Watanabe, K. Koyama, and T. Miyasaka

(第5章)

6. Photoelectrochemical Response by Proton Transport of Halorhodopsin

Y. Saga, K. Koyama, M. Sumi, N. Kamo, T. Miyasaka, and T. Watanabe

(第6章)

参考文献

1. バクテリオロドプシンの機能解析と工学応用

佐賀 佳央, 渡辺 正

生産研究, **49**, 154-161 (1997).

国際会議報告

1. Mechanism of Photocurrent Generation from Bacteriorhodopsin at Electrode-Electrolyte interfaces

Y. Saga, K. Koyama, T. Miyasaka, and T. Watanabe

8th International Conference on Retinal Proteins (1998).

謝 辞

本論文を終えるにあたり、本研究をご指導いただいた東京大学生産技術研究所 渡辺正教授に心から感謝いたします。

本論文を審査していただき、また貴重なご助言をいただいた軽部征夫教授、小宮山真教授、荒木孝二教授、長棟輝行教授に感謝いたします。

高度好塩菌をいただき、またいろいろご指導、ご討論していただきました富士写真フィルムの小山行一博士、宮坂力博士に感謝いたします。

ハロロドブシンを提供していただき、またいろいろとご指導していただきました北海道大学の加茂直樹教授、鷲見正人博士に感謝いたします。

研究室での実験や討論などを通じて多大なご協力をいただいた吉田章一郎博士、高寺喜久雄博士に感謝いたします。

秘書として研究室の事務関係でお世話になりました竹内（森田）麻理さん、佐々輝魅子さん、ありがとうございました。

バクテリオロドブシンに関する研究をともに行ってくれた石川智子学士、入江拓学士に感謝いたします。

渡辺研究室の歴代の学生のみなさんには、研究生活をおくるうえでいろいろお世話になりました。そして、生産技術研究所第4部のみなさんにも励ましていただいたり、楽しませていただきました。ありがとうございました。

最後に、研究生活を物心両面から支えてくれた両親と弟に心から感謝の意を表します。

1999年2月

佐賀 佳央



