

紫膜の厚さおよび長距離構造の原子間力顕微鏡観測

(名古屋大院・工¹, SII ナノテク(株)², 群馬大院・工³)○尾崎 聡¹, 東 陽介¹, 渡邊 直哉², 横山 泰範¹, 園山 正史³, 美宅 成樹¹

【序論】

バクテリオロドプシンとは高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* の細胞膜にパッチ状に存在する、紫膜中に存在する膜タンパク質の一種である。このバクテリオロドプシンは構造が既知であることや安定性が高いことから、膜タンパク質のモデルとして広く研究が行われている。円偏光二色性(CD)を用いた近年の研究により、アルカリ pH や高温条件にすると規則的に配列していたバクテリオロドプシンの二次元結晶構造が融解することが明らかになっている^{1,2}。今回、バクテリオロドプシン周囲の相互作用変化について調べるために、原子間力顕微鏡(AFM)の環境制御システムの構築とアルカリ化した紫膜の定点観測を行った。

【実験】

原子間力顕微鏡は SPA400(SII ナノテクノロジー)を用いた。まず、原子間力顕微鏡内で段階的に観察用セル内の pH を変化させて観察を行うために、図 1 のような溶液循環による環境制御システムの構築を行った。

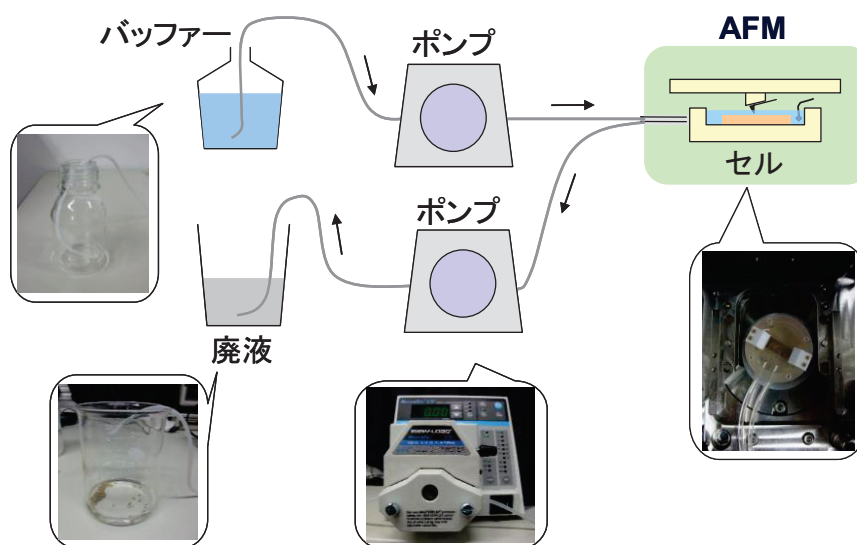


図 1 溶液循環による環境制御システム

pH 7 に調整した紫膜試料をマイカ上に滴下し 15 分間吸着させた後、数時間装置の安定を待つて観察を行った。その後、環境制御システムを用いて広域緩衝液³の置換を繰り返し、pH 7,8,9,10,11,12 における紫膜表面形状の観察を行った。

【実験結果および考察】

観察の結果、pH 7 から pH 9 まではバクテリオロドプシンの二次元結晶構造が観察されたが、pH 10 においては二次元結晶構造を形成する紫膜の厚さの厚い部分と形成しない薄い部分がそれぞれ断片的に存在することが観察された。pH 11,12 については二次元結晶構造を観察することはできなかった。(図 2)

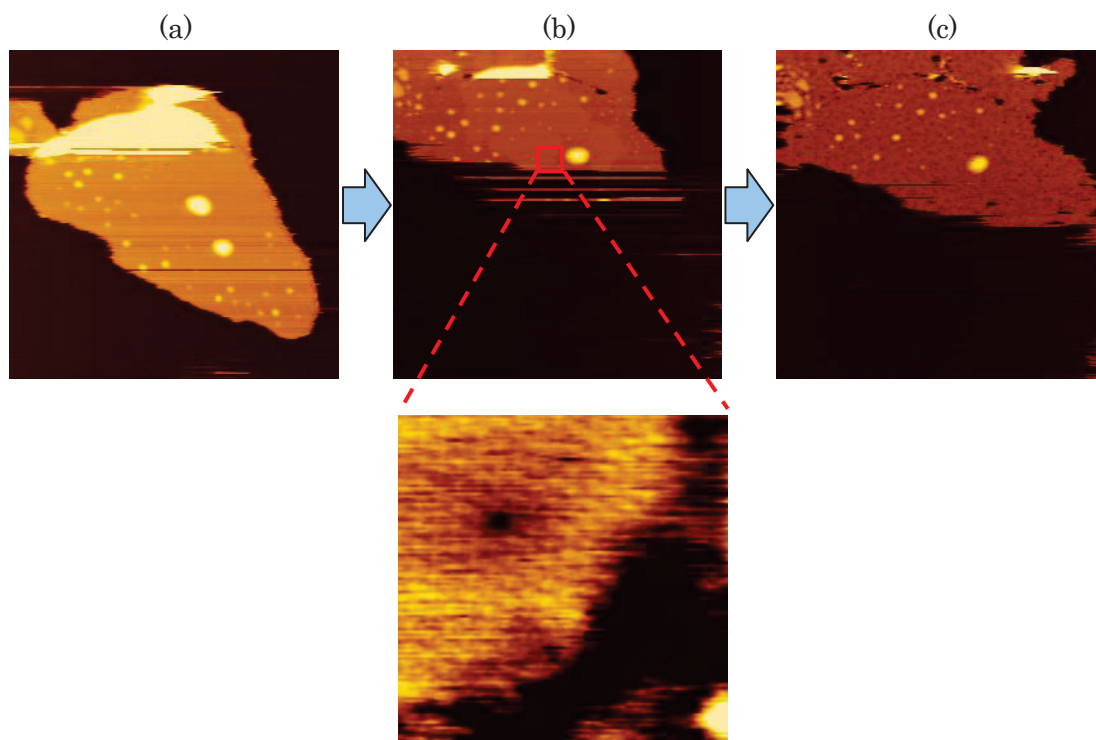


図 2 紫膜表面の観察結果
(a)pH 7 (b)pH 10 (c)pH 12

紫膜の厚さに関して解析を行うと pH が中性からアルカリに変化するほど紫膜の厚さが減少する傾向が見られた。また、pH 7 において存在していたドーム状に厚みを持つ点が pH の増加とともに増加し、pH 10 付近を境に減少する傾向が見られた。さらに、その点と点の距離についても長くなっている傾向が見られることから、紫膜自体が pH とともに広がっていることが窺える。

以上の結果から、pH によるバクテリオロドプシンの変性は 1 つ 1 つの膜が段階的に変性しているということが分かった。また、アルカリ条件において紫膜自体が薄くなっていることから、バクテリオロドプシンが紫膜中で傾いている、もしくは α ヘリックスやループなどの二次構造が壊れていることなどが示唆される。

【参考文献】

1. Yasunori Yokoyama, Masashi Sonoyama and Shigeki Mitaku, *Proteins*. **54**, 442-454.(2004)
2. Yasunori Yokoyama, Masashi Sonoyama, Tatsuhiko Nakano and Shigeki Mitaku, *J. Biochem.* **142**, 325-333.(2007)
3. Walter R. Carmody, *J. Chem. Educ.* **38**, 559-560.(1961)