

## 古細菌型ロドプシンのカーボンナノチューブへの内包

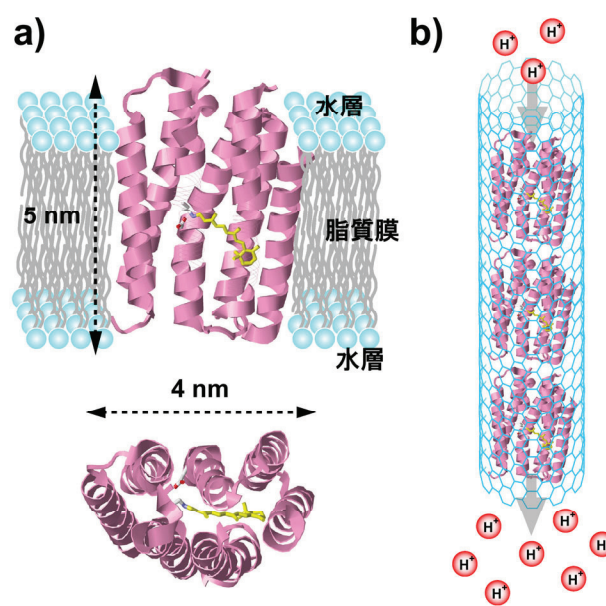
(名工大院工<sup>1</sup> 産総研ナノテクノロジー<sup>2</sup> 首都大東京<sup>3</sup>  
産総研ナノチューブ応用研究センター<sup>4</sup> 分子研<sup>5</sup>)

○川島崇睦<sup>1</sup>、柳和宏<sup>2,3</sup>、劉崢<sup>4</sup>、古谷祐詞<sup>1,5</sup>、末永和知<sup>4</sup>、片浦弘道<sup>2</sup>、神取秀樹<sup>1</sup>

**【序】** 材料科学の分野では、カーボンナノチューブ (CNT) に様々な分子を内包し、新しい物性の発現を試みるといった研究が活発に行われている。例えば、光受容蛋白質・ロドプシンの発色団分子であるレチナルの内包はすでに実現しており、その *cis-trans* 異性化が視覚化されている<sup>1</sup>。その一方、CNT に蛋白質を内包した研究報告は皆無である。その理由として、単層 CNT (内径 ~1 nm) のサイズや内部の疎水性が挙げられるが、このような問題点は多層 CNT (MWCNT; 内径 5-10 nm) に疎水面をもった適当なサイズの膜蛋白質を導入することで解決できるかもしれない。また、向きを揃えて導入した膜蛋白質が光に応答するのであれば、光応答性のイオン輸送ナノワイヤーを作製することが可能かもしれない。我々はこのような発想のもと、光駆動イオンポンプ能をもつロドプシンの MWCNT への内包を試みている。

我々は最近、光駆動プロトンポンプである海洋性バクテリア由来のプロテオロドプシン (PR) を用いて、MWCNT への吸着特性の評価方法を確立した。その結果、PR の MWCNT への吸着は、試料の物理的、化学的、生物的特性に依存して変化することがわかった。本発表では、我々の研究戦略とともに、これまでに得られた結果をまとめて報告したい。

**【実験】** PR の野生型は、Cys107、156、175 の酸化により長時間の安定性が得られないため、これらのシステインをセリンに変異させた Triple-Cysteine-Mutant (TCM) を使用している。本研究では、PR 以外の古細菌型ロドプシンとして、シアノバクテリア由来のプロトンポンプ (GR)、光駆動クロライドポンプ (pHR)、負の走光性センサー (ppR)、フォトクロミズムセンサー (ASR) の吸着実験も行った。MWCNT は Nanocyl 社から購入し、560-600 度で開端処理し、超音波を使用することで 1% DM 溶液に分散させた。



**図 1** a) 脂質膜中の古細菌型ロドプシン。図中には代表的な膜蛋白質であるバクテリオロドプシン (BR) の結晶構造を示した。プロテオロドプシン (PR) の結晶構造は未解明であるが、BR と一致度が 22.9%、相似性が 51.9% であるため、類似した構造をしていると考えられる。いずれも水溶性部分が少ないという特徴をもつ。 b) カーボンナノチューブ (内径 5-10 nm) に古細菌型ロドプシンを配向性良く導入することが可能であれば、光応答性のイオン輸送ナノワイヤーが作製できるかもしれない。

## Experimental Scheme

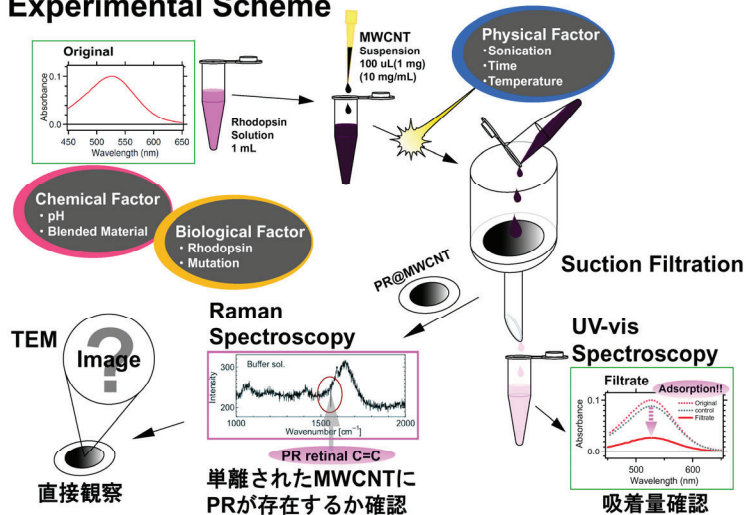


図2 実験構成図

物理的、化学的、生物的ファクターを変え、条件を振る。フィルター処理後、ろ液の紫外可視吸収スペクトルを測定する。単離したMWCNTに対して、ラマン分光法、高分解能透過電子顕微鏡法により計測。

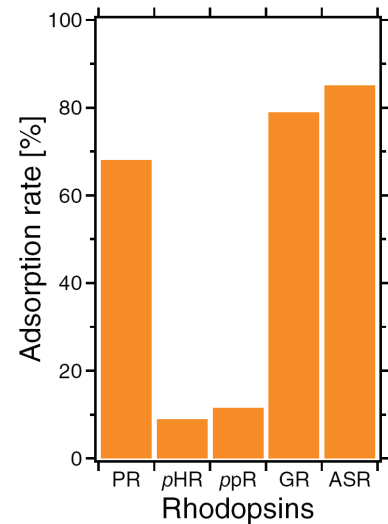


図3 同条件でMWCNTと混合させた種々のロドプシンにおける吸着量の比較。同じ古細菌型ロドプシンでありながら大きく異なっている。

**【結果と考察】** 我々はこれまでにさまざまな条件を検討し、MWCNTへのPRの吸着量を評価する系を確立した(図2)。具体的には、MWCNTを1 mg [(10 mg/ml) 100 uL]、PR (300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 300 mM imidazole, 0.1 % DM, pH 7.0)を0.1 ODmLとし、PRとMWCNTを30分間混合し、吸引ろ過によりMWCNTを単離した。フィルター処理後のろ液に含まれるPRの吸収スペクトルを測定することで、MWCNTに吸着したPRの量を計算した。単離されたMWCNTに含まれるPRをラマン分光により確認する一方、高分解能透過電子顕微鏡法によるCNTの直接観察を試みている。

PRのMWCNTへの吸着については、時間・温度・超音波などの物理的ファクター、pH・塩などの化学的ファクター、アミノ酸変異の導入などの生物的ファクターが及ぼす影響を検討してきた。その結果、蛋白質の安定性が問題となる物理的ファクターには必ずしも明確な最適条件が得られなかった一方、pHや塩の存在によって吸着は大きく異なっていた。特に、pHは吸着に大きな影響を及ぼし、酸性側で吸着の増大がみられた。またPRだけでなく、種々の古細菌型ロドプシンにおける吸着量を比較したところ、かなり異なった吸着のパターンが得られた(図3)。それぞれのロドプシンでは表面電荷に違いがみられるが、表面電荷量だけで吸着量を説明することはできず、細胞質側と細胞外側の電荷分布などが関わっていることが示唆された。

吸着したロドプシン分子のうち、どれだけがMWCNTの内部に存在するか調べるためにはCNTに対する開端処理の有無で検討できるはずであるが、加熱操作によりCNT試料の性質が大きく変わってしまうため、今のところ、ロドプシンが内包されたという証拠は得られていない。吸着の最適化条件がほぼ得られたので、現在はロドプシンのCNTへの内包を結論するため、電顕による直接観察も含めてさまざまな検討を行っているところである。

## 【参考文献】

[1] Liu et al. *Nature Nanotech.* 2, 422 (2007).