

## 4B18

### 表面増強赤外分光法による古細菌ロドプシン単分子膜の光反応の検討

(ベルリン自由大学 物理学研究科) ○安宅憲一、Joachim Heberle

【序】細胞膜上に存在する様々な膜受容タンパク質は、光、電位等の外部信号を受けてその構造を変化させながら細胞内へ情報を伝達すると同時に、この信号を複合的に判断し環境に応じてその反応を自ら制御できる。この様なタンパク質反応機構の解明は、生物の多様な機能の本質的理解に迫ると同時に、この機能を模したインテリジェント分子のデザインにも寄与すると期待される。本研究ではこの様な「バイオ修飾電極」によるタンパク質機能解析の一例として、古細菌ロドプシン（センサリーロドプシンII: SRII）の高配向なタンパク質単分子膜を構築し、その光サイクル反応時の構造変化の様子を表面増強赤外分光法(SEIRAS)により検討した。さらに、電極電位を制御する事により、細胞膜における膜間電位差を印可した状態を吸着タンパク質に再現できる。様々な電位制御下で上記計測を行い、光サイクル反応時における膜間電位差の影響を検討した。

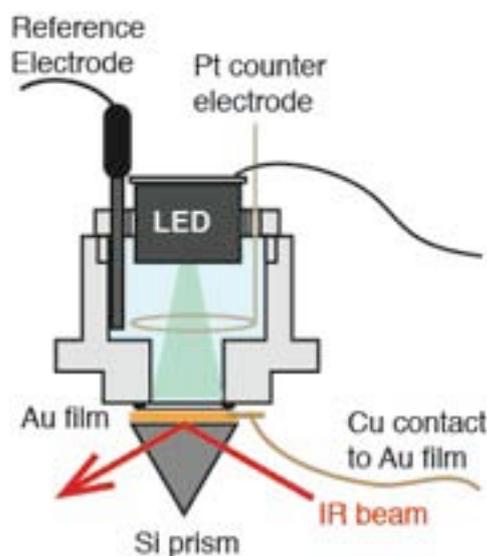


図1 表面増強赤外分光法の実験セットアップ

【実験】図1に表面増強赤外分光法の実験セットアップの概略図を示す。Siプリズム上に金薄膜を無電解メッキ法により作成した。金薄膜は吸着種のシグナル増強と同時に、電極としても用いた。赤外プローブ光はプリズム後方より全反射条件で入射し(ATR-Krestchmann光学配置) SEIRAスペクトルを測定した。光サイクル反応の励起光源としては500nm波長のLEDを用いた。サンプルには *Natronobacterium pharaonis*由来のSRIIを可溶化、精製したものをを用いた。金電極上への高配向タンパク質単分子膜の作成には、アフィニティークロマトグラフィーの原理を応用した。金属電極表面をニッケル-ニトリ

ロトリアセチック酸(Ni-nitrotriactic acid: Ni-NTA)を末端にもつチオール化合物で自己集合的に修飾する。この表面にHis-tag標識されたSRIIを導入し、His-tagとNi-NTAの特異的に配位結合を介して、高配向に単分子吸着させる。SRIIは界面活性剤で可溶化して配向吸着させた後、Bio-beadsを用いて脂質二分子膜内に再構成させた。

【結果および考察】 図2に様々な電位におけるセンサリーロドプシンII (SRII) 単分子膜の光反応時における構造変化のSEIRAスペクトルを示す。-0.4 Vを境にスペクトルが大きく変化している。SRIIは光反応時に幾つかの反応中間体を経るが、この実験条件下では最も反応速度が遅い中間体がスペクトルとして捕らえられる。ここで >-0.4Vで見られるスペクトルはO-中間体、<-0.4Vの領域の物はM-中間体に対応する。この変化は-0.4Vを境に光反応律速がO-からM-中間体に移行したことを示している。また電位の変化によって生じる電極表面の局所的なpH変化を特定のアミノ酸残基 (Asp193) が感知しプロトン化される事が明らかとなった。これがシグナル伝達経路の水素結合ネットワークの再配列を誘引し、光センサー分子のレチナール周りの構造を変化させて反応中間体の律速状態をコントロールしている事が示唆された。

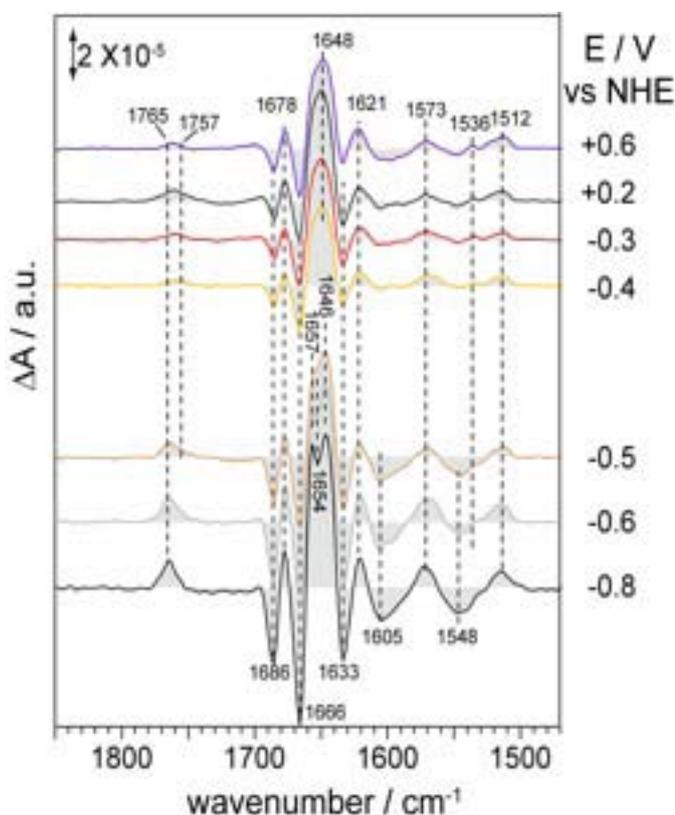


図2. 様々な電位におけるSRIIの光反応のSEIRAスペクトル

【参考文献】 1) Xiue Jiang, Martin Engelhard, Kenichi Ataka\*, and Joachim Heberle, J. Am. Chem. Soc., 132 (31), 10808-10815 (2010)