

研究報告書

「時間分解表面増強赤外吸収分光法による光受容タンパク質単分子膜の動的挙動の解析」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：安宅憲一

1. 研究のねらい

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。このよう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。本研究は電極表面上にタンパク質を固定化した“バイオ修飾電極”を構築し、その反応を電位によって制御しタンパク質の持つ複雑で多様な機能を分子レベルで解明することを目標とする。具体的には、種々の古細菌ロドプシン類の光反応を主な研究対象とする。

2. 研究成果

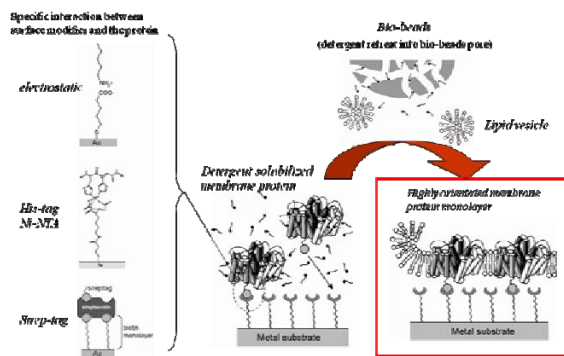


図1. 膜タンパク質単分子膜の作成プロセス

この研究で要となるのは、単分子膜の状態を高感度に観測できる表面増強赤外分光法（Surface Enhanced InfraRed Absorption Spectroscopy: SEIRAS）という計測法を用いる事である。SEIRASは電極に吸着した分子の赤外吸収スペクトルを数十～百倍に増強させる。古細菌ロドプシン類の光反応時のシグナルはタンパク質全体の吸収強度の約5%程度と非常に小さい上に、単分子膜という極微量（ $<10^{-9}$ mol/cm²）からのシグナルを捕ら

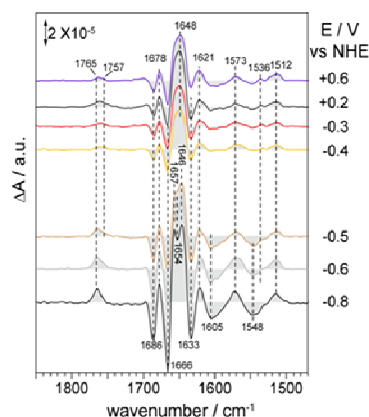


図2. 様々な電位におけるセンサリーロドプシンII (SRII) 単分子膜の光反応時のSEIRASスペクトル

えるには、SEIRASの増強効果は不可欠となる。二つ目の要は、電極表面上に規則的に配向しかつ脂質二分子膜内に再構成された膜タンパク質の単分子膜を構築する事である。これ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(図1)。Ni-nitorilotriacetic acid(Ni-NTA)基を末端に持つ自己集合単分子膜を電極上に形成し、これにタンパク質上に標識したヒスチジン・タグを特異的に相互作用させて吸着させる。このタンパク質単分子膜をバイオビーズ等を用いて脂質二分子膜内に再構築する。

2.1 センサリーロドプシン単分子膜の光サイクル反応における膜間電位差の影響

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 $>-0.4\text{ V}$ で見られるスペクトルは O-中間体、 $<-0.4\text{ V}$ の領域の物は M-中間体に対応する。この変化は -0.4 V 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。

2. 2 自己集合タンパク質単分子膜のデザインと評価

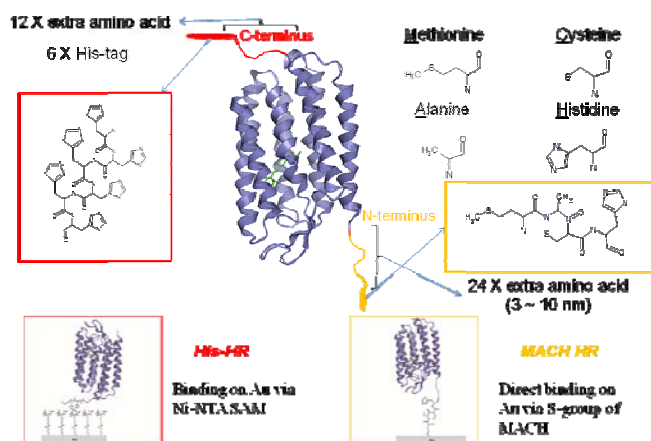


図 3. MACHハロロドプシンの分子構造

さらに、直接高配向な単分子膜を作成できるようなタンパク質を作成した。このタンパク質はN末端にメチオニン(Methionine: M)・アラニン(Alanine: A)・シスチン(Cysteine: C)・ヒスチジン(Histidine: H)の配列を持つためMACHと呼んでいる(図3)。MACHタンパク質を金属電極表面に露出するとヒスチジンのチオール基(-SH)を介して直接共有結合的に吸着させる事が出来る。図4に金属表面に各々ヒスタグとMACHを用いて作成したハロロドプシン(HR)単分子膜のスペクトルの比較を示す。ヒスタグを介してHRを吸着させると 1400 cm^{-1} 以下の波数領域にNi-NTAによるバンドが強く現れている(図4a)。これはHRの吸着反応によってNi-NTA基の構造が変化した事に由来するが、

Ni-NTA自己集合単分子膜をリンカー分子としてタンパク質の単分子膜を作成する方法は、タンパク質を精製する為に標識したヒスチジン・タグを応用するため汎用性があるが、反面、条件によってはタンパク質を励起した際にNi-NTA SAMも同時に反応して赤外吸収のバンドが重なり、スペクトルの解析が煩雑になるという欠点が生じる事がある。この欠点を補う方法として、リンカー分子を介

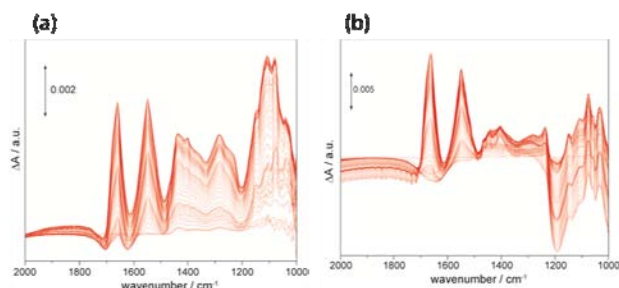


図 4. (a)His-tag/Ni-NTA相互作用、(b)MACH基を通じて金電極表面への吸着したハロロドプシンのSEIRAスペクトル

HRよりNi-NTA基がより電極表面に近い状態のためSEIRASの性質で強く現れる。この状態でタンパク質の機能計測を行うと 1400 cm^{-1} 以下の波数領域はこの吸収によって肝心のタンパク質のバンドが覆い隠されてしまう。一方MACHを用いて吸着させると、Ni-NTAのバンドは観測されずより広い波数領域でタンパク質のスペクトルの計測が可能となる(図4b)。

2.2 電位変調赤外分光法によるビオロゲンチオール単分子膜の電気化学的酸化還元反応

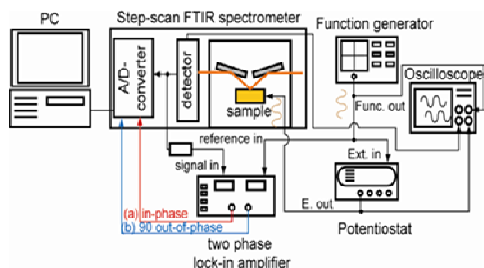


図5. 電位変調赤外分光法の実験セットアップ

料の反応速度論的な知見を得る事が出来る。この手法をビオロゲンチオール(メルカプトベンジルピリジン:MBBP)単分子膜の酸化還元反応のダイナミクス計測に応用した。検出する位相を変化させるに従いスペクトルの強度が変化し、分子の応答が変調(周波数=17Hz)に対して約 200° の位相角で遅れている(図6a)。これは約35msとなり、他の方法で求めたビオロゲンチオールの反応の遅れ時間と一致した。

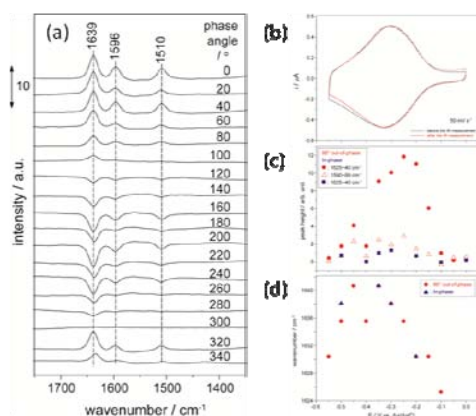


図6. (a)様々な位相におけるMBBPの電位変調IRスペクトル、(b)MBBPのサイクリックボルタンメトリー、(c)様々な中心電位におけるMBBPバンドの強度と(d)バンドピーク位置

また、変調の中心電位を変化させて様々な電位でスペクトルを測定した結果、 1639cm^{-1} と $1596, 1510\text{cm}^{-1}$ のバンドでは極大となる電位が異なっていた(図6b-d)。前者はMBBPラジカルカチオンのモノマーに、後者はラジカルカチオンダイマーに帰属される。電位変調したときの、極大電位は夫々の反応種の酸化還元電位に相当する。各々の極大電位の違いは、モノマーとダイマーで酸化還元電位が異なっていることを示唆している。この様に、電位変調赤外分光法を用いることにより、電極表面上に混在する夫々の反応種の酸化還元電位を個別に求める事が可能となる事が示された。

3. 今後の展開

SEIRAS を用いて、電極上に固定した古細菌ロドプシン単分子膜の光反応のスペクトルを計測することに成功した。また、モデル分子(MBBP)を用いて、変調赤外分光法による単分子膜の反応ダイナミクスを計測することも可能となった。残る課題はこの二つを組み合わせる「古細菌ロドプシン単分子膜の光反応ダイナミクスを計測する」ことであるが、これが未だに成功していない。主な問題は(1)時間分解計測の際に原因不明のノイズによって生じるアーティファクトバンドが期待されるシグナルよりも大きい(2)変調赤外分光法をタンパク質に応用したとたんに再現性が悪くなることである。(1)に関してはハードウェアの問題でありノイズの原因(電源、ポンプ、振動など)を一つ一つ検証して除去してゆく。また(2)に関しては、再現性の問題はおもにタンパクの失活によるためであると考えられるので、失活しない実験条件(pH、イオン強度、レーザー照射の強度など)を検証してゆく。

4. 自己評価

研究課題名が示すとおり、タンパク質単分子膜の時間分解赤外スペクトルを測定する事が

この研究の第一の課題であった。しかし、現在までの所この目的を果たすまでには至っていない。研究初期の段階で、種々の実験条件におけるタンパク質単分子膜の定常状態の計測から、膜タンパク質反応に対する膜間電位の影響を観測できた事は大きな成果であった。この成果と、過去の時間分解赤外スペクトル計測の経験から、本研究はスムーズに進行できるものと多少楽観視していたが、ふたを開けてみると未解決の実験条件が多数残ってしまった。研究実施場所の移動で、新しい海外研究機関との契約の調整や研究室の立ち上げに時間がかかってしまった事から、実質的な研究期間が1年半程度であった事も最終課題に至る事が出来なかった一因として悔やまれる。これらの研究課題は現在も進行中であり、今後、この研究を継続・発展させてゆくに十分な実験機材を揃える事が出来たことは大きな前進であったと考えている。

5, 研究総括の見解

微小シグナルを定量的に扱うことに積極的に挑戦し、たんぱく分子機能を振動分光から解明しようとする大変挑戦的な課題であった。表面増強赤外分光法(SEIRAS)および変調時間分解赤外分光法を計測手法に用いて、光受容たんぱく単分子膜の計測を可能にしたことは大いに評価できる。研究環境を整備するための助走期間があったため計測したい対象について、必ずしも完成度の高い成果は得られなかったようであるが、これまでの成果を基礎にこれからの発展が大いに期待される。動的な挙動を追跡しようとする野心的な研究を継続いただきたい。

6, 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1.) Xiue Jiang, Martin Engelhard, Kenichi Ataka*, and Joachim Heberle, "Molecular Impact of the Membrane Potential on the Regulatory Mechanism of Proton Transfer in Sensory Rhodopsin II." *J. Am. Chem. Soc.*, 132 (31), pp 10808–10815, (2010)
2. Seigo Shima and Kenichi Ataka, "Isocyanides inhibit [Fe]-hydrogenase with very high affinity", *FEBS Lett.*, 585, 353-356. (2011)
3. Henning Krassen, Sven T. Stripp, Nadine Böhm, Albrecht Berkessel, Thomas Happe, Kenichi Ataka, Joachim Heberle, "Tailor-Made Modification of a Gold Surface for the Chemical Binding of a High-Activity [FeFe] Hydrogenase", *Eur. J. Inorg. Chem.*, 7, 1138-1146 (2011)
4. Kenichi Ataka, Ionela Radu, Melanie Nack, Henning Krassen, and Joachim Heberle, "Surface-Enhanced InfraRed Absorption Spectroscopy (SEIRAS) of membrane protein monolayer", *Eur. Biophys. Journal with Biophys. Lett.* vol. 40 suppl. 1, 227-227 (2011)
5. Kenichi Ataka, Tilman Kottke, and Joachim Heberle, "Thinner, Smaller, Faster: IR Techniques to Probe the Functionality of Biological and Biomimetic Systems." *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 2-11 (2010)
6. Ballout, F., Krassen, H., Kopf, I., Ataka, K., Bruendermann, E., Heberle, J., and

Havenith, M., “Scanning Near-field IR microscopy of proteins in lipid bilayers” ,
Phys. Chem. Chem. Phys., DOI:10.1039/C1CP21512D

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

招待講演

‘Effect of membrane potential on the photo-cycle of Sensory Rhodopsin studied by surface enhanced Infrared spectroscopy’ Trilateral Symposium on NanoBio Integration, 2010, Berlin, Germany.

‘Function of Membrane Protein Monolayer Formed on the Electrode Surface Studied by in-situ Vibrational Spectroscopy’ International Society of electrochemistry, 6 2nd annual meeting, 2011, Niigata Japan