

## 論文の内容の要旨

論文題目 電子伝達性蛋白質の自己組織的集積化に関する研究

氏名 清水雅史

### 1. 緒言

情報化社会の高度化に伴い、電子デバイスの高密度化が求められている。そこで、素子としての機能を持つ分子を作る分子素子の研究が進められている。分子素子としては、ダイオード、スイッチ、光電変換、メモリーなどの機能の実現が考えられるが、生体内に於いては電子伝達系、光合成反応中心、イオンポンプ、バクテリオロドプシンなどのタンパク質やタンパク質複合体において同様の機能が分子サイズの空間で実現されており、これらを利用した生体分子素子の研究が進められている。タンパク質を素子として利用するには、タンパク質を集積化して利用することが考えられるが、タンパク質分子を所望の位置に配向性を制御しつつ配置してタンパク質分子のパターンを形成することは、Langmuir-Blodgett法をはじめとした既存の分子集積化技術では難しい。そこで、任意の位置にタンパク質分子を配置するためには、構成分子に自己組織化能を付与することが有効であると考えられる。さらに、分子の自己組織化を利用することにより、分子の集積化を短時間で行うことができると考えられる。本研究では生体分子を用いて電子デバイスを作製することを目指して、チオール化合物の金表面に対する自己組織化を利用した方法とオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを利用した方法によってタンパク質分子を集積化することを試みた。機能性生体分子のモデル分子としては、大腸菌由来の電子伝達性タンパク質シトクロムb562（以下b562）を用いることにした。b562は置換可能なヘムを1つ保持しており、容易にアポ体（apo b562）を得ることができる。これまでに、中心金属の異なるポルフィリンとapo b562を再構成させることによって、酸化還元電位の異なる変異体を得られることが示されており、これらを酸化還元電位の順に沿って配列させることによってダイオード特性を得ることができるものと考えられる。本研究では、自己組織的にb562を集積化するために、ヘムやアポタンパク質部分を介してb562に自己組織化能を付与し、得られた分子を基板上に自己組織的に集積化する技術の開発を目的とした。

## 2. チオール導入ヘム誘導体による金表面に対する自己組織化

分子を金属表面に自己組織的に集積化するために頻りに用いられる方法として、金属表面に対するチオール化合物やジスルフィド化合物の自己組織化を利用する方法が挙げられる。ここでは、プロピオン酸基を介してジスルフィド基を導入したヘム (SS=Heme) を合成し、これと再構成させたb562 (R-b562) の金表面に対する自己組織化を試みた。金表面への非特異的吸着によるb562の変性を抑えるために、あらかじめ金表面をジチオ酢酸 (DTDAA) で修飾し (図1.a)、この表面に対するR-b562の集積化 (図1.b) と基板上におけるタンパク質部分の脱離 (図1.c)、再構成 (図1.d) の様子を表面プラズモン共鳴現象 (SPR) を用いて観察した。さらにこれらの蛋白質を集積化した状態でのCDスペクトルを測定し、蛋白質の二次構造解析を行った。

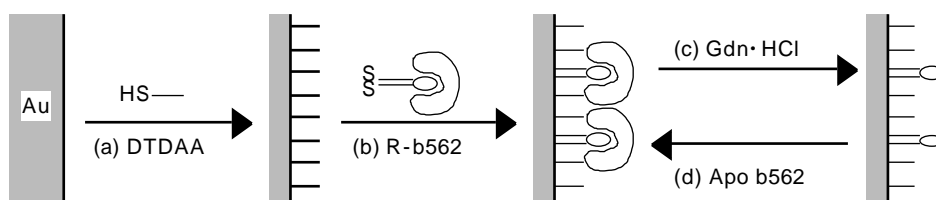


図1.観察した一連の集積化過程

### [ 実験方法および結果 ]

集積化過程における膜厚変化の測定結果を図2に示した。金表面をDTDAA修飾すると膜厚は1nmになった。この表面にR-b562溶液を接触させ、MilliQ水でリンスすると膜厚は4nmになり、native b562の場合に比べて膜厚が大きくなった。b562が保持しているヘムのプロピオン酸基はb562の長軸に対して55°傾いていることが知られており、この3nmの膜厚増加はヘムを導入したジスルフィド基を介してR-b562が金表面に結合している可能性を示唆している。一方、DTDAA修飾していない金表面をnative b562溶液やR-b562溶液と接触させた際には、膜厚はそれぞれ1.6nmと2.2nmになった。これらの値はともにb562の短軸方向の長さ (2.5nm) よりも小さく、タンパク質が変性して吸着しているものと考えられる。これらのことから、金表面をDTDAA修飾することにより、変性を抑えてR-b562を金表面に集積化することができたと言える。

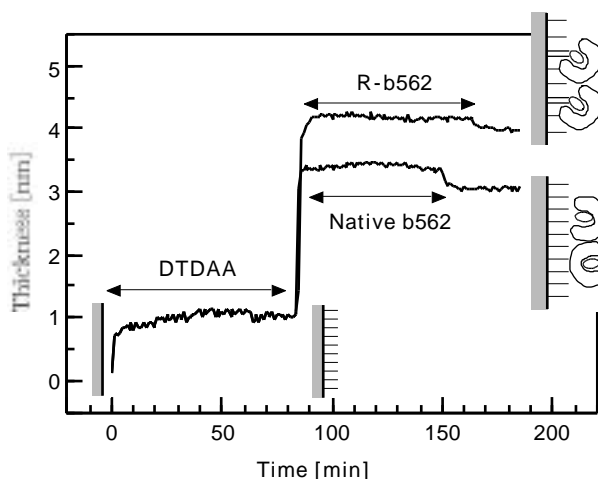


図2.集積化過程の観察

さらにCDスペクトルを測定し、集積化状態における蛋白質の二次構造解析を行った。R-b562の  $\alpha$ -ヘリックス含量は溶液中においては93%であったが、R-b562を未修飾基板上に集積化した際には35%にまで低下していたのに対し、表面をDTDAA修飾した基板上では55%であった。この結果は上述したSPR測定による膜厚変化から得られた結果を強く支持している。

次に、このようにR-b562を集積化した金基板から、アポタンパク質部分だけを除去することを試みた (図3)。pH8に調整した4Mや6Mの塩酸グアニジン溶液 (Gdn·HCl) と接触させた際には膜厚の低下は見

られなかったが、pHを5に調整した8MのGdn・HCl溶液との接触によって膜厚が約0.5nmにまで低下した。DTDAA修飾しただけの金基板やSS=Hemeを自己組織的に集積化した金基板をGdn・HCl溶液処理しても膜厚の低下が見られなかったことから、この膜厚減少はDTDAAの脱離によるものではなく、金基板に結合したR-b562からアポタンパク質部分だけが取り除かれていることを示している。これは、b562におけるヘムの軸配位子がHisとMetであり、pH5においてはHisがプロトン化されて軸配位子とヘムとの相互作用が弱まることにより、アポタンパク質部分とヘムの解離が起こりやすくなるためであると考えられる。さら

にこの基板をapo b562溶液と接触させると、膜厚がGdn・HCl処理する前の値に戻った。これは、基板に取り残されたSS=Hemeがapo b562と接触した際に基板上において再構成が起こっていることを示している。また、先のGdn・HClによるアポタンパク質部分の除去によって基板に取り残されたヘムは溶媒に露出した状態を保っていることを示唆している。

以上、ジスルフィド基をb562のヘムに導入することにより、金表面にb562を自己組織的に集積化することができ、また、集積化した表面において可逆的にアポタンパク質部分の脱着を行うことができた。

### 3. オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの利用

Langmuir-Blodgett法や上記に掲げたチオール化合物の自己組織化を利用した方法では、タンパク質の膜を作製することはできても、タンパク質分子を所望の位置に配置してパターンを形成することは難しい。一方、オリゴヌクレオチドのパターンを形成する方法は、DNAチップ作製的手段として、フォトリソグラフィなどの方法が確立されている。そこでオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを利用してタンパク質分子を集積化することを考えた。元来Cysを1つも含まないb562に遺伝子工学的に1つだけCysを導入し、b562-SHを作製した。さらにそのCysを介して二価性試薬を用いて24merのリンカーオリゴヌクレオチド（以下LO）を付加してb562-LOを作製した。また、LOと相補的な配列をもつオリゴヌクレオチド（以下cLO）を付加したヘム（以下heme-cLO）を合成した。これらの分子の自己組織的な集積化の様子をSPRによって観察した。

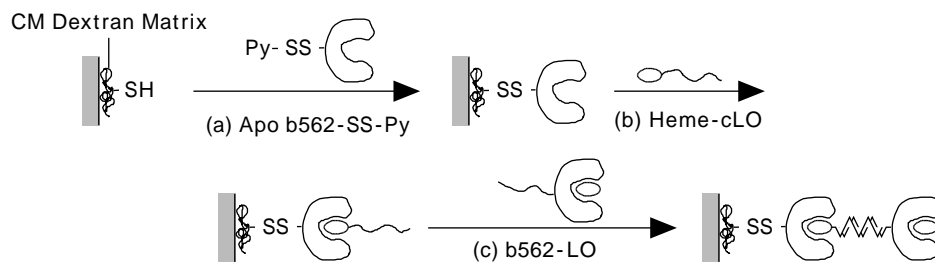


図4ハイブリダイゼーションを利用した集積化のスキーム

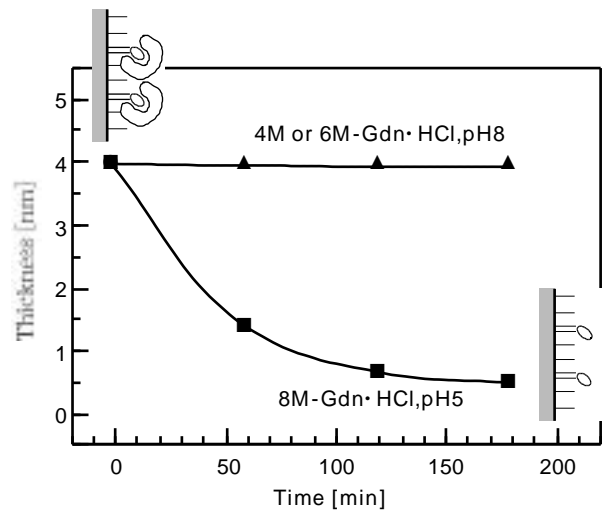


図3.アポタンパク質部分の脱離過程

## [ 実験方法および結果 ]

図4に、heme-cLOの再構成とb562-LOのハイブリダイゼーションを利用したb562の2段目までの集積化のスキームを示した。まず、カルボキシメチルデキストラン層で覆われているセンサーチップ表面にチオールを提示し、そこにapo b562-SS-Pyを流して (図4.a) apo b562 を固定化した。そこにheme-cLOを流し (図4.b)、さらにb562-LOを流して (図4.c) b562分子をさらに2段目まで集積化した。

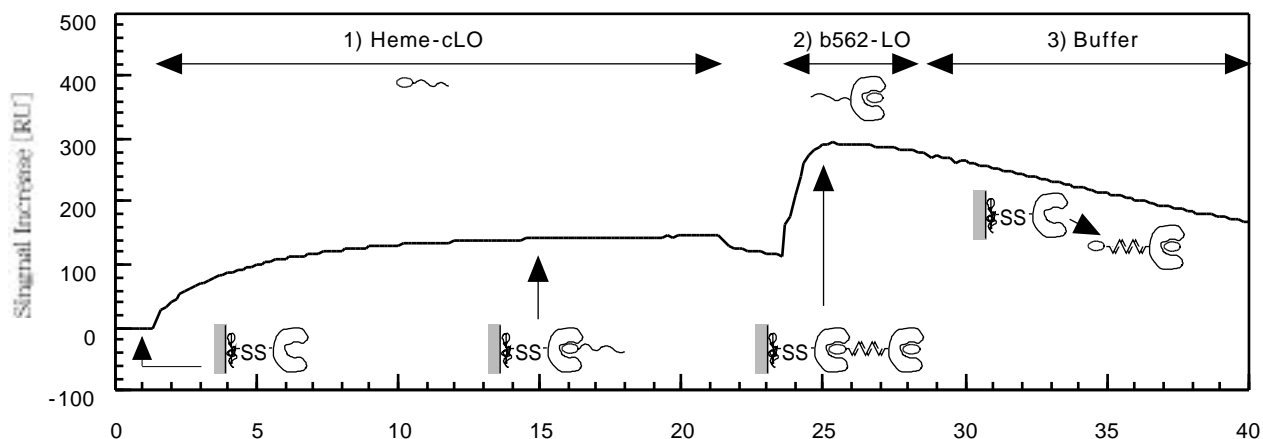


図5.heme-cLOとb562-LOの集積化

apo b562 を固定化してから後のSPRシグナルの変化の様子を図5に示した。apo b562を固定化したセンサーチップ上にheme-cLOを集積化した (図5の1の領域)。その後にb562-LOを5分間流すとシグナルがさらに大きく上昇した (図5の2の領域)。オリゴヌクレオチドの部分が相補的でない場合にはシグナルはほとんど上昇しなかったことから、このシグナル上昇はオリゴヌクレオチド部分のハイブリダイゼーションによってb562-LOが集積化されていることを示している。以上、ヘムとアポタンパク質の相互作用とオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを利用することにより、2段目までb562分子を自己組織的に集積化することができた。

しかし、b562-LOを流している間にSPRシグナルはプラトーになることなくオーバーシュートし (図5の2の領域)、さらにバッファに切り替わると次第にSPRシグナルは減少している (図5の3の領域)。このシグナルの減少から解離速度定数を求めると $7.9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ であり、heme-cLOにおける値 ( $6.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) に近いことから、この解離はハイブリダイゼーションの部分の解離ではなく、主に基板に固定化されているapo b562とb562-LO/heme-cLO複合体のヘム部分の解離によるものと考えられる。

## 4. 結言

- 1) 水溶性の電子伝達性タンパク質シクロムb562に自己組織化能を付与するために、ヘムを介してジスルフィド基を導入し、R-b562を調製した。R-b562がDTDAAで修飾した金表面に集積化されることを膜厚変化、CDスペクトルによる二次構造解析の両面から確認した。さらに、基板上におけるアポタンパク質部分の可逆的な脱着を行うことができた。
- 2) オリゴヌクレオチドを付加したb562-LOとheme-cLOを調製した。これらの分子がヘムとアポタンパク質の相互作用とハイブリダイゼーションによって2段目まで自己組織化する事を確認した。