

バクテリオロドプシン/ポリビニルアルコールハイドロゲルの光電流特性に 及ぼす凍結-融解処理の効果

山内 健*・河野 敏行*・大島 賢治*・下村 雅人*・宮内 信之助*

Takeshi YAMAUCHI, Toshiyuki KAWANO, Kenji OSHIMA, Masato SHIMOMURA and
Shinnosuke MIYAUCHI

Effect of Freezing-Thawing Treatment on Photoresponse Characteristics of Bacteriorhodopsin/Poly(vinyl alcohol) Hydrogel

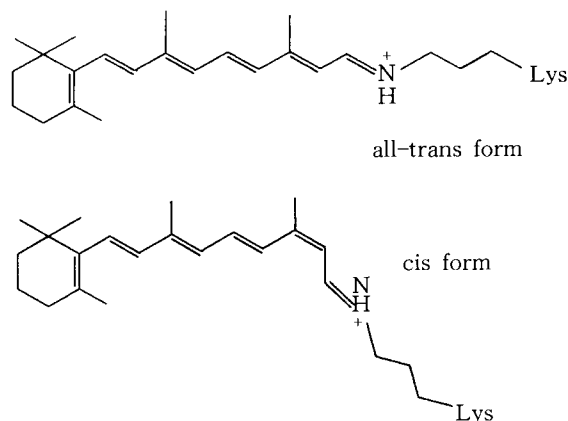
Bacteriorhodopsin (bR)/poly(vinyl alcohol) (PVA) hydrogel device was prepared by freezing-thawing of an aqueous solution containing PVA and bR, and photoresponse characteristics were studied. The photoelectric measurements under continuous light irradiation were made with a xenon lamp ($75\text{mW}/\text{cm}^2$) and then the photocurrent obtained was amplified by potentiostat.

Both absorption at 560nm and the photocurrent of the bR/PVA hydrogel were increased by the increase of the number of freezing-thawing of bR/PVA aqueous solution. As electric field between 0–0.4V was applied toward bR/PVA film, increasing of the absorption and the photocurrent was also observed. Evidence was suggested that freezing-thawing and applied electric field to the bR/PVA hydrogel device influence bR molecules oriented to electrodes.

Key words: Bacteriorhodopsin, Poly(vinyl alcohol), Hydrogel, Photoresponse characteristics, Freezing-thawing

1. 結 言

生物は光、熱、音など外部からの刺激に応答して、生体内の種々の機能や過程を調節している。眼の網膜中のロドプシンと呼ばれるタンパク質は光に応答して、自身が構造変化することにより光電流を発生して光による情報を伝えている。1971年、Oesterheltらによって光合成細菌*Halobacterium salinarium*が発見され、この細胞膜は紫膜と呼ばれ感光性タンパク質バクテリオロドプシン (bR) を含むことが報告された¹⁾。紫膜は直径 $0.5\mu\text{m}$ 、厚さ 5 nm の円形膜で bR が 75wt% を占め、残り 25wt% は脂質である²⁾。bR はロドプシンと同様に光電流特性³⁾ を有し、細菌は短期間で大量培養できる利点を有する。また、ロドプシンは一度光を照射すると分解代謝するタンパク質であるが、bR は分解せず再生するので、明所で容易に単離できる。bR は 1 分子あたり 1 分子のレチナール (スキーム 1) を含んでおり、レチナールは 560nm の光を吸収して、全トランス型からシス型へ異性化する。これを暗所に放置するとゆっくりと全トランス型にもどる。このレチナールの光異性化で bR 分子内にプロトン置換が生じ、これにより、光電流発生が誘起されると考えられている⁴⁻⁷⁾。レチナールは細長い形をしており、その



Scheme 1. Structure of retinal schiff base with all-trans and cis form.

長軸方向の共役系に平行な光を最も強く吸収し、垂直な光は吸収しないので、レチナールが含まれている bR の配向性は重要になってくる⁸⁾。bR を溶液セル中の隔膜⁹⁾ としたり、ラングミュア-ブロッジェット (LB) 法¹⁰⁾ により単分子膜を積層して光学素子への応用が検討されたが、これらは機械的強度および材料加工性に欠ける。

一方、電極表面上の紫膜溶液に電圧を印加すると bR 分子の双極子モーメントのため、紫膜は電気泳動の原理で向きをそろえて電極上に沈着する報告がある⁸⁾。また、bR を含む光硬化樹脂に高電圧を印加して bR 分

原稿受付：平成10年5月28日

*長岡技術科学大学生物系

子を配向させることで、光電流値を上昇させた例もある¹¹⁾。bRと高分子を複合化することによりこれらの欠点を補い、なおかつ光電流特性を保持した電子材料の作製が可能である¹²⁾。

ポリビニルアルコール (PVA) は成型性や工業的有用性の面で優れており、bRとの複合化についての報告例もある¹³⁾。一般にケン化度の高いPVAは凍結-融解処理により、PVA間に水素結合が形成され、架橋密度が増えることでゲル化することが知られており^{14, 16)}、この性質を利用することで、bRのPVA内への包括固定が期待できる。水ゲルは保水性に優れるため、タンパク質や酵素の活性を維持しやすいと考えられるが、凍結-融解処理を施したPVA水ゲルへのタンパク質固定の例はない。さらに、電場をかけてbRをPVA内で配向させることで、光電流特性を制御できる可能性がある。

本研究では bR/PVA に凍結-融解処理および電圧印加処理を施すことによる水ゲルの光電流特性への影響について検討した。

2. 実験

2.1 試料

PVA(重合度1700, けん化度99.6%)は、クラレ(株)製を使用した。bRの抽出および精製は Oesterhelt¹¹⁾らの方法に準じて行った。実際には好塩 *Halobacterium salinarium* 菌を蛍光灯により1,000Luxの光を照射しながら39℃, 10日間培養した後にデオキシリボヌクレアーゼIで溶菌し、その後bRを抽出し、さらにショ糖密度勾配分離にて精製した。得られたbR濃度は560nmでのモル吸光係数($\epsilon = 63000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)より求めた¹¹⁾。

2.2 bR/PVA水ゲル素子の作製

bR/PVA水ゲル素子の作製は以下の方法で行った。10% (w/w) PVA水溶液をオートクレーブを用いて、121℃で15分加熱して溶解した。このPVA水溶液を室温にて攪拌しながら15.7mgの紫膜を溶解させた。この溶液をITOガラス基板(シート抵抗 $10 \Omega / \text{mm}^2$, 100 mm^2)にキャストすることによって図1のようなサンドイッチ型 bR/PVA 素子を作製した。PVA水ゲルの厚さはポリ塩化ビニル製のスペーサー(厚さ0.4mm)により一定にした。凍結-融解処理は、この素子を-20℃以下で23時間凍結させた後、室温で1時間融解させた。この操作を反復することで、bR/PVA水ゲル素子を作製した。

2.3 光応答特性の測定

bR/PVA 水ゲルの光吸収については可視-紫外分光光度計(島津製作所(株)UV-3100PC)を用いて発色団であるレチナールの560nmの吸光度を測定した。光電流の測定は、キセノンランプ(ウシオ電機(株)UI-501C)を光源に使い、素子の温度変化を小さくするための赤外吸収フィルター(東芝硝子(株)IRA-25S)を通して白色光を測定用素子に照射した(図2)。光電流はポテンショスタット(北斗電工(株)HA-301)で増幅し、ペンレコーダ(千野製作所(株)EB22005)により記録した。電場配向処理は、ポテンショスタットを用いて、両電極間に-0.4~0.4Vの電圧を印加して行った。

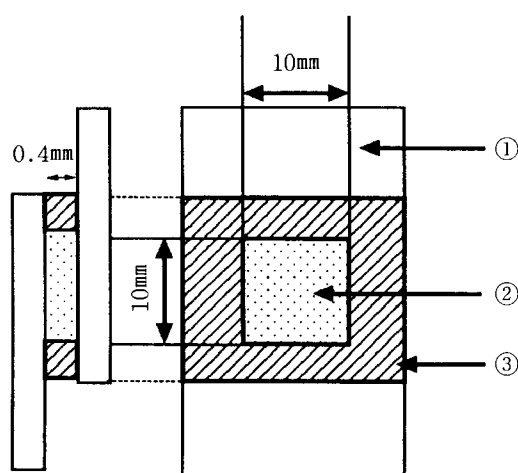


Figure 1. Schematic illustration of sandwich-type photo-cell of bR/PVA hydrogel. ①, ITO glass electrode; ②, bR/PVA gel; ③, spacer.

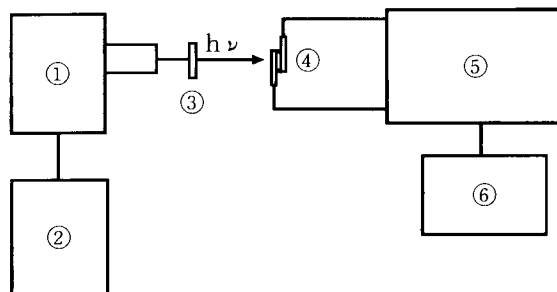


Figure 2. Apparatus of the photocurrent measurements for bR/PVA hydrogel. ①, xenon lamp; ②, xenon lamp power supply; ③, IR cut filter; ④, bR/PVA photo-cell; ⑤, potentiostat; ⑥, pen recorder.

3. 結果と考察

3. 1 凍結-融解処理によるbR/PVAハイドロゲル素子の光電流特性への影響

凍結-融解処理によりPVAは側鎖のOH基同士の水素結合数が増え、これによりPVAはゲル化する。このようなPVAゲルの動的弾性は処理前の10倍以上増加し、機械的強度および材料加工性にも優れた電子素子の作製が可能である。

bRによる光電流はレチナールが光吸収により全トランス型からシス型へ異性化する際のレチナール分子間の電荷の置換に誘発されるので、bR/PVAハイドロゲルの凍結-融解処理と560nmの吸光度の関係について調べた(図3)。bR/PVAハイドロゲル素子では凍結-融解処理回数に比例して吸光度は0から約0.4と上昇していった。PVA膜では、凍結-融解処理回数に関わらず、この波長の吸光度の変化はほとんどみられなかった。処理回数の増加とともにPVAセグメント間の水素結合数が増え、これにより三次元架橋が徐々に進行し、強固なハイドロゲルとなる。これと共にbR中のレチナール分子の共役系の長軸方向に平行な光を最も強く吸収するレチナール数が増加したため、bR/PVAハイドロゲル素子の吸光度が上昇したと考えられる。

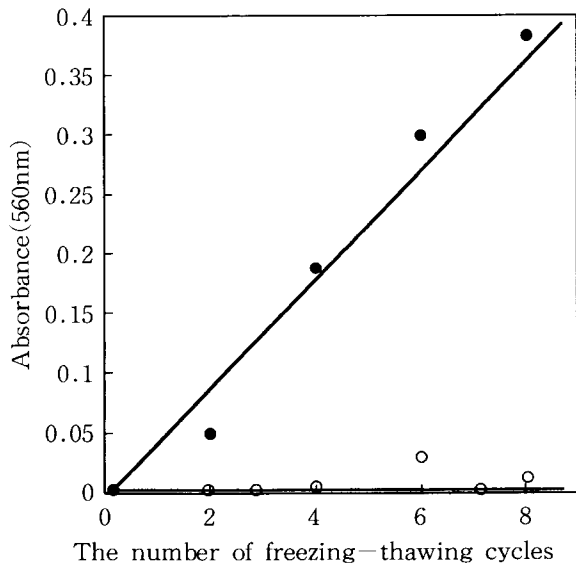


Figure 3. Relation with effect of freezing-thawing cycles on absorbance of photo-cell at 560nm. ●; bR/PVA hydrogel, ○; PVA hydrogel.

図4に凍結-融解処理前のbR/PVA素子(a)および処理を4回繰り返したときのbR/PVハイドロゲル

素子(b)の光電流の時間変化の一例を示す。ここでは光電流値は3回の光照射/停止サイクルで得られるピークの平均から求めた。bRの光電流の発生は、以下の1から3の段階で進行すると考えられている^{6,7)}。

- (1) 光励起によるレチナールの異性化で、bR分子内に方向性を有するプロトン置換が生じ、これにより一方向の電流が誘起される。
- (2) 定常光のもとではbR分子内のプロトン分布が平衡に達して光電流は0になる。
- (3) 光照射を停止することによりbR分子内のプロトン分布が初期状態に戻るので、逆電流が生じる。

ここで得られた結果は Miyasaka らの光電流プロファイルとほぼ同じであり⁶⁾、凍結-融解処理前後のbR/PVA素子は光照射直後に光電流は鋭い立ち上がり、すぐに減少した。次いで3分後に光照射を停止することにより、逆電流を生じた。どちらの素子も同じプロファイルを示すので、同じ機構により光電流が発生したものと考えられる。この光電流は光照射/停止の繰り返しにより同じように観測され、処理前に比べ、処理後ではbR/PVAハイドロゲル素子の光電流値は約3-4倍増大した。さらに図5に凍結-融解処理回数とbR/PVAハイドロゲル素子の光電流値の関係を示す。bR/PVAハイドロゲル素子は凍結-融解処理を8回まで繰り返すことにより、光電流値は 40 ± 5 から $320 \pm 25 \text{ nA/cm}^2$ と処理回数にほぼ比例して上昇した。光電流の増加は吸光度と同様の傾向を示している。図4と図5での光電流値の上昇は、光吸収により異性化したレチナール数が増え、これによって誘発されるプロトン置換も増加したためと推定した。

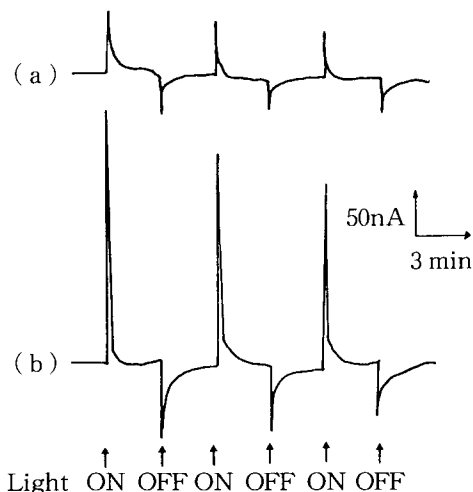


Figure 4. Time profiles of photo-current of photo-cell before (a) and after (b) freezing-thawing cycles treatment for four times.

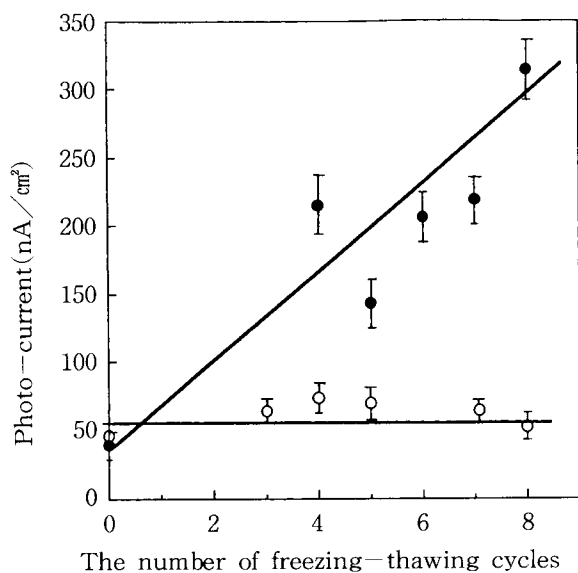


Figure 5. Relationship between freezing-thawing cycles and photo-current of photo-cell.

●; bR/PVA hydrogel, ○; PVA hydrogel.

また、PVAハイドロゲルにおいても、凍結-融解処理の有無にかかわらず、50-75nAのバックグラウンド電流が生じた。この原因としてPVAの誘電特性による電流の発生が考えられるが、bR/PVAハイドロゲルの凍結-融解処理で観測される光電流値はこれより多く、凍結-融解処理がbR/PVAハイドロゲル素子の光電流特性に影響を与えていることがわかった。

図3、図5でbR/PVAハイドロゲル素子は吸光度、光電流とも凍結-融解処理回数と共に値が大きくなるが、吸光度に比べ、光電流の方が凍結-融解処理回数に対して相関性が悪い。この原因としては、bR分子と電極間の距離が関係していると考えられる。すなわち、電極間距離が長いと電極上での光吸収で生じたレチナールの電荷分布密度が低く、光電流が効率的に発生しないためと考えられる。

3. 2 電圧印加によるbR/PVAハイドロゲルの光電流特性への影響

Koyamaらは抗体を結合させたbRを用いて、これを電極上に配向固定したLB膜を作製した¹⁷⁾。電極上にbRのカルボキシル基末端が同一方向に配向した場合には高い光電流が生じ、逆にアミノ基末端を配向させた場合には光電流はほとんど流れなかった。bRに電圧を印加するとbR分子の末端基の向きをそろえて電極上に沈着できるので、容易に末端基の方向を制御することが期待できる^{9, 10)}。そこで、bR/PVAハイドロゲル素子に電圧印加処理を行い、印加電圧と光電

流値の関係を調べた。図6に-0.4Vから+0.4Vの電圧を30分印加した後に、図4と同様に3分間の光照射/停止を3度繰り返したときの光電流値の平均値を示す。なお、光照射側の電極が+極となるよう設定して電圧を印加した。0Vから+0.4Vでは、電圧の増加とともに、光電流値も増大し、+0.4V印加した時に 225 ± 25 nA/cm²となった。これ以上電圧を印加すると電極表面が変質してしまい、電極として使用できなかった。一方、0Vから-0.4Vでは、電圧印加による光電流値の変化はほとんどみられなかった。正電圧を印加した場合、bRのカルボキシル基末端が、光照射側の電極(+極)に配向し、負電圧を印加した場合、アミノ基末端が、光照射側の電極(+極)に配向するため⁹⁾、Koyamaらの報告と同様に、正電圧の印加により、光電流値が増大したものと考えた。

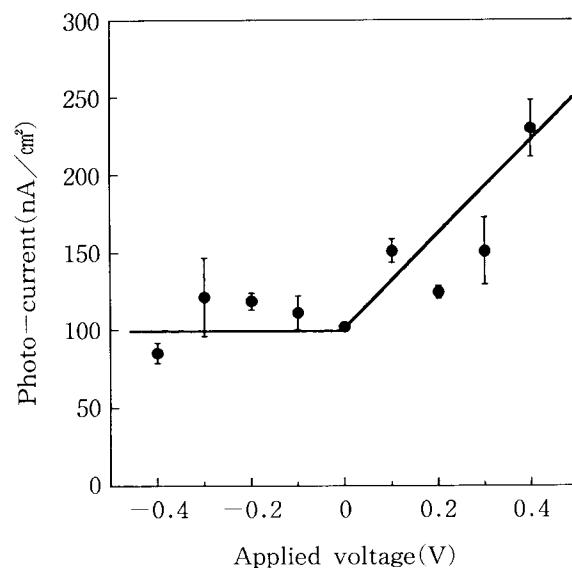


Figure 6. Photo-current of bR/PVA applied at various voltages.

図7に、印加時間を変えてbR/PVA素子に+0.4Vの電圧印加処理を行った後に、さらに3分間の光照射/停止サイクルを3度繰り返したときの光電流値の平均値を示す。電圧印加時間を10, 30, 60, 120分と増加させたが、光電流は30分のときに 225 ± 25 nA/cm²と最も高い値を示し、電圧を印加しない場合に比べて2倍以上大きい値となった。また、電圧印加時間30分以降では、光電流値が急激に減少した。bRは光分解代謝型のロドプシンと異なり、bR中のレチナールが560 nmの光を吸収して全トランス型からシス型へ異性化した後、bR分子はJ→K→L→M→N→Oの6中間体を経て、もとのbR状態へ戻る。中間体の寿命はpH

や電場により変化することが知られており、電圧印加時間30分以降では長時間に渡る電圧印加によりもとのbR状態に戻らなかったと考えられるが、この急激な光電流値の減少については検討中である。

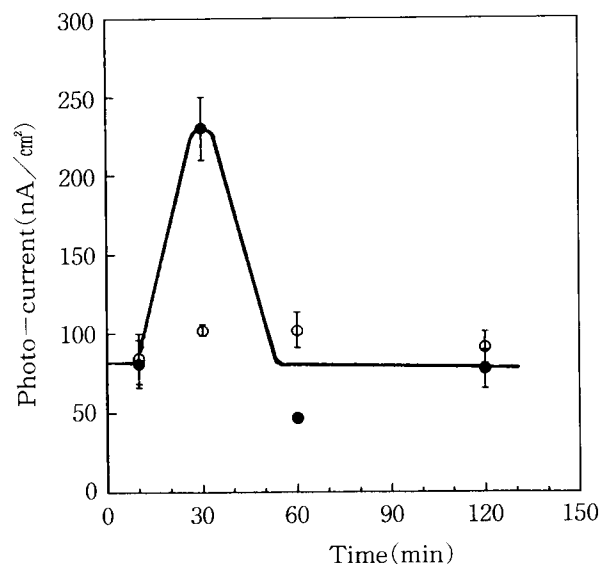


Figure 7. Time profiles of photo-current of bR/PVA under +4 V applied.

●; bR/PVA, ○; PVA.

3. 3 電圧印加と凍結-融解処理の光電流への効果

bR/PVAハイドロゲルに凍結-融解処理を施すことで、処理回数に比例して、吸光度および光電流値ともに上昇した。また、bRのカルボキシル基末端が、光照射側の電極(+極)に配向するように電圧を印加することでも光電流値が上昇することが明らかとなった。電圧印加と凍結-融解処理を併用することで、bR/PVAハイドロゲル素子の光電流量増加が期待できる。そこで、電圧+0.4Vを30分印加した後に凍結-融解処理を施す一連の操作を繰り返してbR/PVAハイドロゲルを作製し、それらの光電流値の測定について検討した(図8および図9)。bR/PVAハイドロゲルの吸光度は処理回数4回までは回数とともに上昇し、4回において0.37ともっとも高い値を示し、その後、吸光度は一定となった(図8)。凍結-融解処理のみを施したハイドロゲルに比べ、吸光度は処理回数2回では3倍、4回では2倍ほど増加しており、電圧印加と凍結-融解処理を併用することにより吸光度の増加がみられた。4回以降、吸光度は一定となるが、これは、凍結-融解処理と電圧印加を併用してもレチナールの配向性がこれ以上、改善されないためと考えられる。

図9に電圧印加処理後に凍結-融解処理を繰り返したbR/PVAハイドロゲル素子の光電流を示す。処理回数0から2回までは処理の増加とともに光電流は上昇し、2回目において電流値は約160nA/cm²となり、その後、光電流は一定となった。光電流は吸光度と同様の光応答特性を示しており、電圧印加により、カルボキシル基末端が光照射側の電極(+極)に配向し、さらに凍結-融解処理によりbR/PVAハイドロゲルの光吸収量が増加したため、このような光電流特性を示したものと推定した。

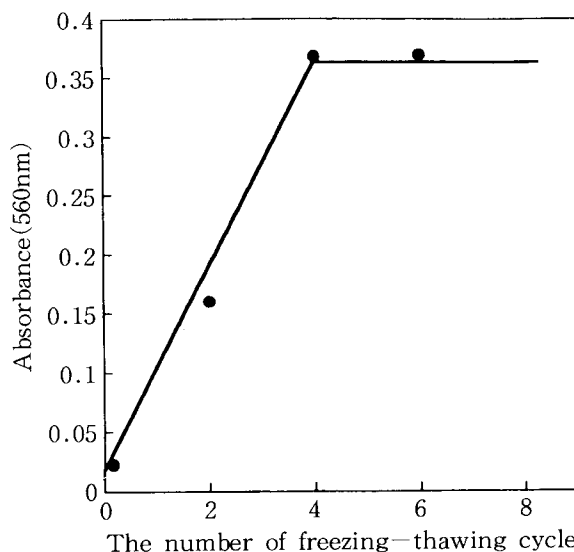


Figure 8. Effect of freezing-thawing cycles on photo absorption of bR/PVA hydrogel obtained after applied voltage treatment.

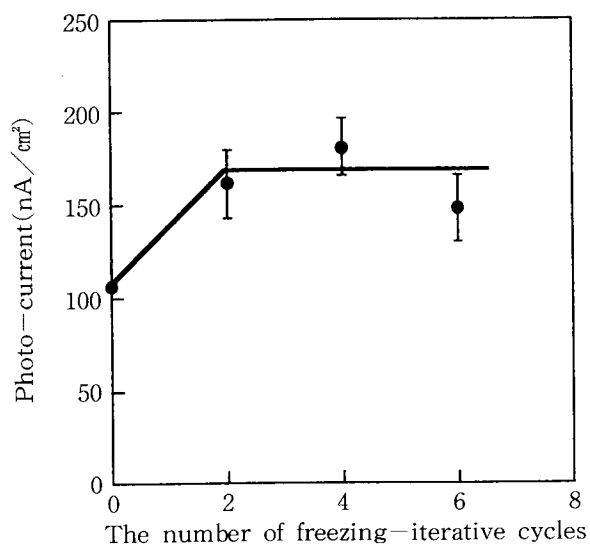


Figure 9. Effect of freezing-thawing cycles on photo-current of bR/PVA hydrogel obtained by +0.4 V applied voltage for 30min.

4. 結 論

bR/PVAハイドロゲルに凍結-融解処理および電圧印加処理を施すことによるbR/PVAハイドロゲル素子の光応答特性への影響について検討した。その結果以下のことが明らかとなった。

- (1) bR/PVAハイドロゲルの凍結-融解処理と光電流特性の関係について調べたところ、凍結-融解処理回数に比例して、吸光度および光電流値ともに上昇した。
- (2) 光照射側の電極電位が+になるように電圧を印加したところ光電流値が上昇した。
- (3) 電圧印加と凍結-融解処理の併用による光電流特性について調べたところ、処理回数2回目までは、吸光度および光電流値ともに上昇した。

参 考 文 献

- (1) D. Oesterhelt and W. Stoerkenius, *Methods Enzymol.*, **31**, 667(1974)
- (2) R. Henderson, *J. Mol. Biol.*, **93**, 123(1975)
- (3) 前田章夫, *生物物理*, **35**, 2, 1(1995)
- (4) R. Simmeth and G. W. Rayfield, *Thin Solid Films*, **57**, 145(1975)
- (5) R. R. Birge, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **41**, 683(1990)
- (6) T. Miyasaka, K. Koyama, and I. Itoh, *Science*, **255**, 342(1992)
- (7) T. Miyasaka, *Jpn J. Appl. Phys.*, **34**, 7 B, 3920(1995)
- (8) G. Varo, *Acta. Biol. Acad. Sci. hung.* **32**, 301(1981)
- (9) Z. Dancshazy and B. Karvally, *FEBS Letters* **72**, 136(1976)
- (10) T. Miyasaka and K. Koyama, *Chemistry Letters*, 1645(1991)
- (11) S. Kunugi, H. Yamada, Y. Nakamura, F. Tokunaga, and A. Tanaka, *Polymer Bulletin*, **18**, 87(1987)
- (12) I. Eroglu A. Aydemir, L. Turker and M. Yucel, *J. Membrane Sci.*, **6**, 171(1994)
- (13) L. Keszthelyi and N. A. Deppas, *Biochem. Biophys. Acta.*, **598**, 429(1980)
- (14) 渡瀬峰男, *日本化学会誌*, **9**, 1254(1983)
- (15) 渡瀬峰男, *日本化学会誌*, **7**, 973(1985)
- (16) S. R. Stauffer and N. A. Deppas, *Polymer*, **33**, 18, 3932(1992)
- (17) K. Koyama, N. Yamaguchi and T. Miyasaka, *Science*, **265**, 762(1994)