

# バクテリオロドプシン薄膜の評価技術

山田俊樹 春山喜洋 笠井克幸 照井通文 田中秀吉 梶 貴博 大友 明

バクテリオロドプシン (bR) は光駆動のプロトンポンプ機能を有しており、bR 薄膜を用いた光センサーデバイスは光照射の ON 或いは OFF の下で、時間微分型の光応答電流を発生する。デバイスの性能評価を行う、あるいは光応答電流の起源を明らかにするうえで、bR 薄膜中の bR の配向を明らかにすることは重要である。本稿では光第 2 次高調発生干渉法を用いて、ディップコーティング法により作製された bR 薄膜が、キラルで極性を有する C<sub>2v</sub> の対称性を持つことを示す。更に bR 薄膜中の bR の絶対的配向についても議論を行う。

## 1 まえがき

バクテリオロドプシン (bR) は高度好塩菌の紫膜中に存在し、プロトン化シッフ塩基レチナル色素をその内部に共有結合により配位したタンパク質である。bR は光吸収によってプロトン (H<sup>+</sup>) を細胞外側に放出し、細胞質側からプロトン (H<sup>+</sup>) を取り込む。この過程では、bR 中のレチナル色素の光異性化反応を伴っており、bR は様々な中間状態を経由した光化学反応サイクルを体験する。このように bR は光駆動のプロトンポンプ機能を有している。また、bR は pH や温度など様々な環境因子に対しても耐性を持っている。上記で述べた光駆動のプロトンポンプ機能と関連した微分光応答を利用した光センサーデバイスが開発されてきた<sup>[1]</sup>。また bR の特徴を利用したその他の様々な光電子デバイスへの応用も提案されてきている<sup>[2][3]</sup>。近年、私たちもこのような機能を利用したバイオミメティックな光センサーデバイスの開発の研究に取り組んでいる。そのようなデバイスの性能評価を行う、或いは光応答電流の起源を明らかにするためには、bR 薄膜の対称性や bR 薄膜中の bR の配向を明らかにすることは重要である。本研究では光第 2 次高調波発生 (SHG) 干渉法を用いて、ディップコーティング法により作製された bR 薄膜の対称性および bR 薄膜中の bR の絶対的な配向 (極性配向の方向性) の評価を行った。

## 2 bR 薄膜の作製と評価

### 2.1 bR 薄膜の作製

bR を用いて様々なデバイスを作製する際にはまず基板上に bR 薄膜を作製する必要がある。bR 薄膜を作製する手法として、ラングミュアプロジェクト (LB) 法、電気泳動堆積法、静電相互作用を利用した層毎の

自己組織化膜作製法、抗原・抗体認識を利用した方法、スピンキャスト法など様々な手法があり、それぞれ利点と欠点を有する<sup>[4]</sup>。本研究では下記で述べるディップコーティング法により bR 薄膜を堆積した。pH 7.2 の 10 mM の Tris-HCl バッファー中において精製した紫膜の薄片からなる溶液を準備した。その溶液中において、bR の濃度は約 4 mg protein/ml であった。約 1 mm の厚さを持つ洗浄したガラス基板を容器にいれた紫膜の溶液中に浸し、500 μm/s の速度で引きあげるにより bR 薄膜を作製した。通常ディップコーティング法では基板の両面に bR 薄膜が堆積される。bR 薄膜の厚さは約 50 nm 程度であった。SHG 干渉法による bR 薄膜の対称性の評価においては、両面に bR 薄膜が堆積された基板をそのまま試料基板として用いた。一方 SHG 干渉法による bR 薄膜中の bR の絶対的配向の評価の際には片面の bR 薄膜をふき取り、試料基板として用いた。

### 2.2 SHG 干渉法による bR 薄膜のマクロな対称性の評価

図 1 はディップコーティング法により基板両面に堆積した bR 薄膜の対称性の評価を行うための SHG 干渉法の光学系を示している。1064 nm の波長のナノ秒パルスレーザーを基本光として用い、532 nm の波長の第 2 次高調波発生 (SHG) を検出した。入射角及び基本光と SHG の偏光状態を選択して測定することができる。

基本光及び SHG の偏光状態をそれぞれ p-p、s-p、p-s、s-s として入射角度を変化させながら測定を行った。p は p 偏光、s は s 偏光を意味する。p-p、s-p、p-s、s-s のうち、C<sub>2v</sub> の対称性において通常観測される p-p、s-p に加えて、p-s においても SHG が観測された。s-s では SHG が観測されなかった。図 2 に p-p と p-s にお

ける SHG の入射角依存性に関する実験結果を示す。基板の両面に堆積された bR 薄膜からの SHG はお互いに干渉する。ガラス基板を回転させることによる光学距離の変化と基本光と SHG の周波数でのガラス基板の屈折率の周波数分散のために SHG の干渉フリンジが観測される。p-p は SHG の非線型感受率のアキラルな成分に関連しており、一方 p-s はキラルな成分に関連している。それぞれの成分の座標変換に対する特性が異なっているため、p-p と p-s で干渉フリンジの位相が反転している。これらの実験結果から、bR 薄膜のマクロナ対称性はキラルで極性を有する  $C_{\infty}$  という対称性を持つことが明らかになった<sup>[5]</sup>。 $\infty$ 対称軸を z (3) として  $C_{\infty}$ 対称性における非線型感受率の各成分は  $\chi_{333}=0.35 \text{ pm/V}$ ,  $\chi_{311}=\chi_{322}=0.2 \text{ pm/V}$ ,  $\chi_{113}=\chi_{131}=\chi_{223}=\chi_{232}=0.2 \text{ pm/V}$ ,  $\chi_{213}=\chi_{231}=-\chi_{123}=-\chi_{132}=0.036 \text{ pm/V}$  の値を持つことが分かった。これらの値は他の手法で作製された bR 膜に対する実験結果とも一致している<sup>[6]</sup>。この他、SHG の円偏光二色性に関する実験においても、キラルで極性を有する  $C_{\infty}$  という対称性を持った 2 枚の膜からの SHG の干渉を観測することによって、興味深い現象が見つかった<sup>[5]</sup>。

### 2.3 SHG 干渉法による bR 薄膜中の bR の絶対的な配向評価

図 3 は SHG 干渉法による bR 薄膜中の bR の絶対的な配向評価を行うための光学系を示している。絶対的な配向（極性配向の方向性）が既に明らかになっているヘミシアニン色素 ( $C_{22}$ -Hemicyanine) とアラキジン酸の混合単分子 LB 膜<sup>[7]</sup> と適当なローカルオシレーターとの SHG の干渉、bR 薄膜と同じローカルオシレーターとの SHG の干渉を比較することにより、bR 薄膜中の bR の絶対的な配向の評価を行った。1280 nm の波長のナノ秒パルスレーザーを基本光として使い、640 nm の波長の第 2 次高調波発生 (SHG) を検出した。基本光と SHG の偏光状態を p-p として、試料基板とローカルオシレーターとの間におかれたガラス基板を回転させて SHG の干渉フリンジを観測した<sup>[8]</sup>。

図 4(a) は bR 薄膜とローカルオシレーターとの SHG の干渉フリンジ、図 4 (b) はヘミシアニン色素とアラキジン酸の混合単分子 LB 膜と同じローカルオシレーターとの SHG 干渉フリンジを示している。SHG に応答するのは bR 中のレチナール色素であるが、それを目安にして、bR の配向を議論することができる。図 4(a) と図 4 (b) で SHG 干渉フリンジのパターンがほぼ一致していることから、ディップコーティング法によりガラス基板上に作製した bR 薄膜において、図 5 のよ

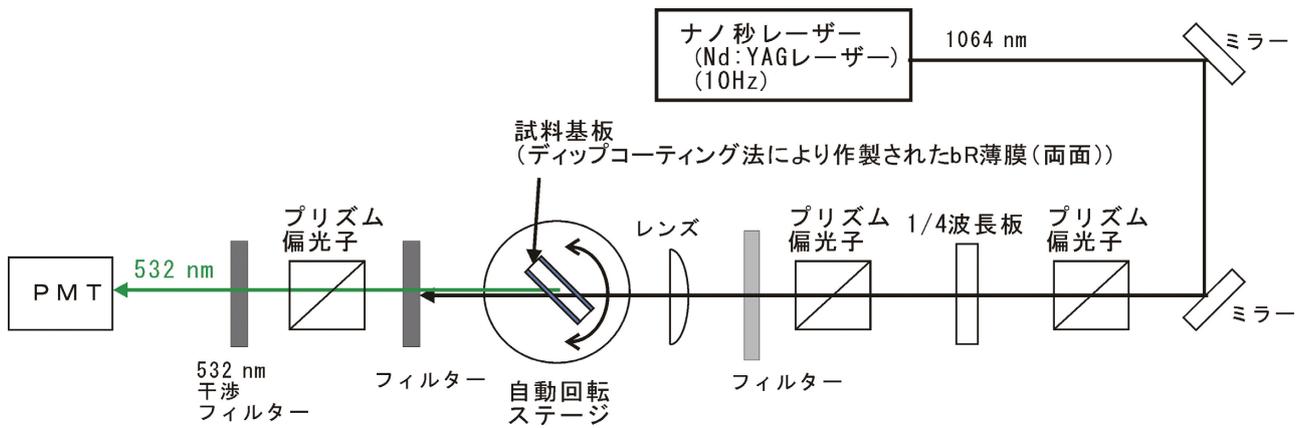


図 1 SHG 干渉法の光学系

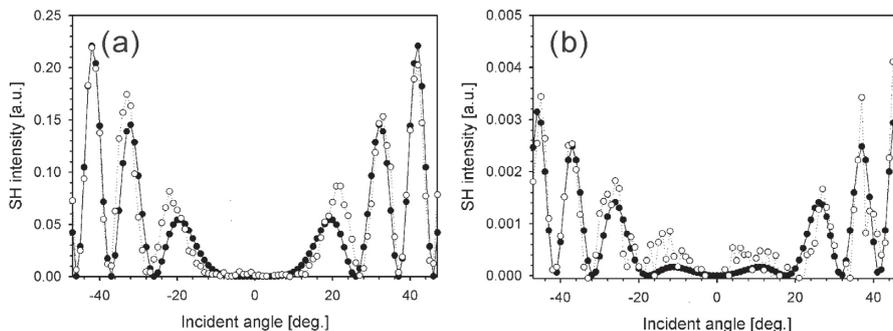


図 2 (a) p-p, (b) p-s における SHG の入射角依存性

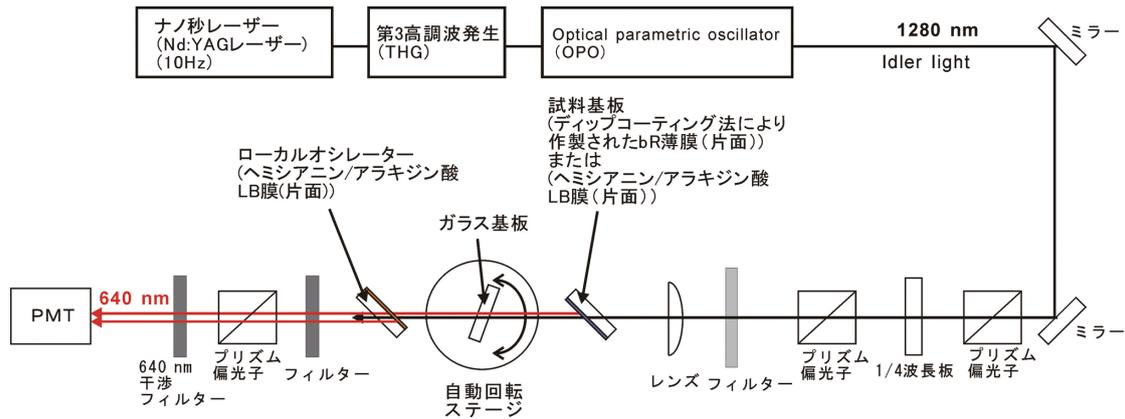


図3 絶対的配向評価のためのSHG干渉法の光学系

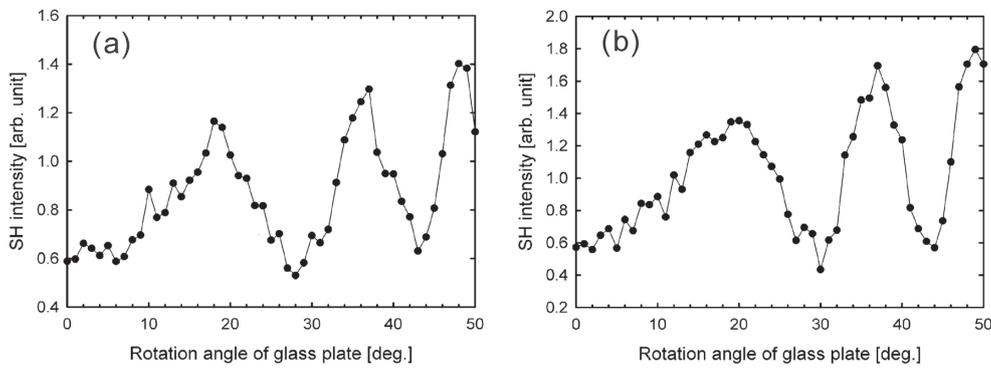


図4 (a) bR薄膜とローカルオシレーターとのSHGの干渉フリンジ  
(b) ヘミシアニン色素とアラキジンの混合単分子LB膜とローカルオシレーターとのSHGの干渉フリンジ

うにbRは細胞質側を空気側、細胞外側を基板側に向けて配向する傾向があることが明らかになった<sup>[8]</sup>。

### 3 まとめ

SHG干渉法を用いてディップコーティング法により作製したbR薄膜はキラルで極性を有するC<sub>2</sub>という対称性を持っており、bR薄膜中のbRは細胞質側を空気側、細胞外側を基板側に向けて配向する傾向があることが分かった。これらは光応答電流の起源を明らかにするためあるいはデバイスの性能向上を図っていく上で重要な知見であると考えられる。

実験からは図5のような配向を有するbRが多いことが明らかになったが、どの程度多いのかは明らかになっていない。今後、bRのより高度な配向制御法を考案し、bR光センサーデバイスの性能向上とともにその特徴を生かした応用を検討していく。

### 謝辞

本研究に一部ご協力いただきましたNHK放送技術研究所の菊池宏博士に感謝申し上げます。

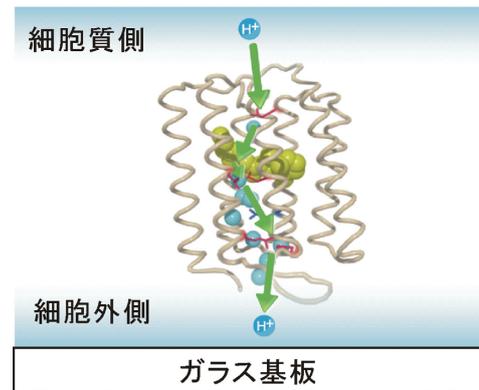


図5 bR薄膜中のbRの絶対的配向

### 【参考文献】

- 1 T. Miyasaka, K. Koyama, and I. Itoh, "Quantum conversion and image detection by a bacteriorhodopsin-based artificial photoreceptor," *Science* Vol. 255, pp. 342-344, 1992.
- 2 K. Bradley, A. Davis, J.-C. P. Gabriel, and G. Grüner, "Integration of cell membranes and nanotube transistors," *Nano Lett.*, Vol. 5, pp. 841-845, 2005.
- 3 N. Arun and K. S. Narayan, "Conducting polymers as antennas for probing biophysical activities," *J. Phys. Chem. B*, Vol. 112, pp. 1564-1569, 2009.
- 4 J.-A. He, L. Samuelson, L. Li, J. Kumar, and S. K. Tripathy, "Bacteriorhodopsin thin-film assemblies -immobilization, properties, and applications," *Adv. Mater.*, Vol. 11, pp. 435-446, 1999.

## 4 ナノ・バイオ融合研究

- 5 T. Yamada, Y. Haruyama, K. Kasai, T. Terui, S. Tanaka, T. Kaji, H. Kikuchi, and A. Otomo, "Orientation of a bacteriorhodopsin thin film deposited by dip coating technique and its chiral SHG as studied by SHG interference technique," Chem. Phys. Lett., Vol. 530, pp. 113-119, 2012.
- 6 M. C. Larciprete, A. Belardini, C. Sibilina, M.-b. Saab, G. Varo, and C. Gergely, "Orientation of a bacteriorhodopsin thin film deposited by dip coating technique and its chiral SHG as studied by SHG interference technique," Appl. Phys. Lett., Vol. 96, pp. 221108-1-3, 2010.
- 7 X. Liu, L. Liu, X. Lu, J. Zheng, W. Wang, and Y. Fang, "Interference second harmonic generation investigation of the chromophore orientation of hemicyanine dye molecules in a Langmuir-Blodgett monolayer," Thin Solid Films, Vol. 217, pp. 174-177, 1992.
- 8 T. Yamada, Y. Haruyama, K. Kasai, T. Terui, S. Tanaka, T. Kaji, H. Kikuchi, and A. Otomo, "Orientation of a dip-coated bacteriorhodopsin thin film studied by SHG interferometry" Jpn. J. Appl. Phys., Vol. 52, pp. 05DB03-1-5, 2013.



**山田俊樹** (やまだ としき)  
未来 ICT 研究所ナノ ICT 研究室主任研究員  
博士 (工学)  
有機材料物性・光計測、ナノ材料



**春山喜洋** (はるやま よしひろ)  
未来 ICT 研究所ナノ ICT  
研究室バイオ材料



**笠井克幸** (かさい かつゆき)  
未来 ICT 研究所ナノ ICT 研究室主任研究員  
博士 (工学)  
量子光学、非線形光学、レーザー制御



**照井通文** (てるい としふみ)  
経営企画部企画戦略室プランニングマネージャー  
博士 (理学)  
物性物理、薄膜、走査型探針顕微鏡、ナノ電子物性



**田中秀吉** (たなか しゅうきち)  
未来 ICT 研究所ナノ ICT 研究室研究マネージャー／テラヘルツ研究センターテラヘルツ連携研究室主任研究員兼務  
博士 (理学)  
ナノ固体物性、走査プローブ顕微鏡および分光測定、物性物理学、ナノスケール構造科学



**梶 貴博** (かじ たかひろ)  
未来 ICT 研究所ナノ ICT 研究室研究員  
博士 (工学)  
レーザー光化学、単一分子分光、ナノフォトニクス



**大友 明** (おおとも あきら)  
未来 ICT 研究所ナノ ICT 研究室室長  
Ph.D.  
ナノフォトニクス、非線形光学