

スラブ光導波路分光法を用いた固液界面における タンパク質の脱離反応のその場観察

松田直樹¹⁾、岡部博隆¹⁾、長村利彦¹⁾、田中 賢²⁾

1)産総研九州センター、2)九大先導研

緒言：スラブ光導波路 (SOWG) 分光法は固液界面に単分子層以下の量で吸着している物質の紫外可視吸収スペクトルをその場観察する事が可能で、演者等はこれまで ITO 電極表面に吸着したチトクローム *c* (cytc) 等のタンパク質と ITO 電極間の直接電子移動 (direct electron transfer : DET) 反応等のその場観察を行ってきた。一方、吸着させた cytc を吸着させた ITO 電極をバインダー等に応用する場合、最大の問題は時間経過とともに cytc の脱離や失活が生じ、数時間後にはほとんど活性が失われてしまう点である。cytc の活性を保ったまま ITO 電極等の表面に固定化するには cytc が脱離しにくい表面修飾方法を見出すことと、それを評価する方法の確立が必要である。そこで本報告では、オートサンプラーを用いてセル内の溶液の自動交換を行い、SOWG 分光法のその場観察から得られる吸収スペクトルの減少から固液界面に吸着させた cytc の脱離反応を評価した結果を報告する。

実験：50×20×0.05mm の薄板ガラス製 (松浪硝子工業) を SOWG として用いた。SOWG 上に滴下したグリセリンに光ファイバーを挿入し光を入射し、伝播した光を集光し再び光ファイバーで CCD 検知器付き分光器 (PMA-11、浜松ホトニクス) まで光を導いた。SOWG 表面はアセトン、エタノール、純水 (Milli-Q 水) で洗浄した。試薬は、市販の cytc (馬心筋、SIGMA)、39 mM のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH 7.41、関東化学) 等を用い、cytc 溶液を PBS で 10 μM に調整し用いた。オートサンプラーは三軸直行ロボット (アイアイ、ICSA3)、ロボット (アイアイ、RCA2)、マイクロペット (ギルソン) を組み合わせたコンピュータで制御した。

結果及び考察：cytc を吸着させた際の SOWG 分光法で行った吸収スペクトルのその場観察結果から、吸着した cytc の Soret 帯のピーク位置は溶液中の cytc の結果と同じ 408nm であり反応中心の構造は保たれている事が確認できた。オートサンプラー洗浄過程は一回当たり 12.3 秒必要である。100 回洗浄して SOWG 分光法の吸収スペクトル変化を観察し SOWG 表面からの cytc の脱離過程をその場観察したところ、一回毎の洗浄過程で脱離反応は平衡に達していた。また 100 回洗浄した際の吸光度の変化は簡単な速度式で相関出来ることが分かった。

$$A=A_0+A_1\exp(-t/\tau_1)+A_2\exp(-t/\tau_2)\cdots(1)$$

ただし、*A*: 吸光度、*A*₀、*A*₁、*A*₂:定数、*t*: 洗浄回数、*τ*₁、*τ*₂: 定数である。またその際、相関後に洗浄回数を無限大に設定することで最終的な吸光度 *A*₀ と最終的に吸着している割合である *A*₀ / (*A*₀+*A*₁+*A*₂) が求められ、脱離反応を評価する方法としての有効性を示せた。