

氏名・(本籍)	なか 中	さこ 迫	まさ 雅	よし 由
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	理博第1182号			
学位授与年月日	平成2年4月25日			
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当			
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程)物理学第二専攻			
学位論文題目	X線回折法によるバクテリオロドプシン光反応中間体Mの 構造研究			
論文審査委員	(主査)			
	教	授	遠藤	康夫
	教	授	徳永	史生
	教	授	小松	啓

論 文 目 次

- 第一章 序論
- 第二章 試料調整, X線回折実験
- 第三章 M中間体安定化条件の吟味
- 第四章 アルギニン処理によるM中間体の安定化
- 第五章 M中間体を蓄積した紫膜に対するX線回折実験
- 第六章 紫膜によるX線の回折とその回折データの処理
- 第七章 M中間体形成時に誘起される構造変化について
- 第八章 議論

論文内容要旨

蛋白質は、非常に複雑な構造を基盤にしてその機能を発揮しているが、その発現メカニズムは明白ではない。現在、さまざまな角度からそのメカニズム探求がなされているが、その中でも、機能発現時の構造情報は、貴重な知見をもたらすと考えられている。本研究では、高度好塩菌ハロバクテリアの形質膜上に産生され、光駆動プロトンポンプ機能を有したバクテリオロドプシン (bR) に着目して、その機能発現時の反応中間状態 M の構造を粉末 X 線回折実験によって調べた。

bR は、7つの疎水性領域 (図 1, A~G) を持つ248個のアミノ酸残基と N 末端から数えて216番目のリジン残基にシッフ塩基を介して結合したオールトランスレチナルからなる膜貫通型の色素蛋白質である。形質膜中で、bR は少量の脂質分子と共に紫膜と呼ばれる分画を形成している。この紫膜は、bR 三量体をモチーフとした二次元六方格子 (空間群 p3, 格子定数 62.7 Å) であるため、回折学的な手法を用いた bR の構造研究に非常に有効な試料である (図 1)。bR 一分子は、長さ約40 Åの膜を貫通する α -ヘリックス7本によって構成されている。

bR は、長い共役二重結合を持つレチナルを持つことにより、光エネルギーを吸収して独特の光化学反応を行う (図 2)。光反応サイクル中、bR は、バクテリア細胞の内側から外側へプロトンを能動的に輸送する。光化学反応は、分光学的に同定された複数個の反応中間状態を経ながら進行し、1サイクルは、数十ミリ秒 (室温下) で完了する。各反応中間体は、固有の吸収スペクトル、安定温度等によって特徴付けられているが、この内、M 中間体が、bR の機能発現に最も重要な反応中間状態であると考えられている。それは、

- ① M 中間体の吸収スペクトルが大きく短波長側に移動していること、
- ② M 中間体では、シッフ塩基が脱プロトン化していること、
- ③ そして、その形成時、bR からプロトンが放出され、崩壊時に bR にプロトンが吸着する等、bR のプロトン輸送機能に密接に関連した事象が生じているからである。

室温下で寿命が数ミリ秒しかない M 中間体の構造を、直接調べるのは非常に困難である。多数枚の紫膜を含む試料に対する粉末回折実験では、いかに強力な X 線源を用いても、短時間の内に精度の高いデータ収集を行うことは不可能に近い。又、試料中の bR の光化学反応を同期させることは困難であり、時間分割測定を行ったところで、得られる情報には、他の反応中間体の構造情報が混入している恐れがある。そのため、本研究では、

- ① M 中間体を安定化させる条件を検討し、
- ② その蓄積を分光学を確認しつつ、静的 X 線回折実験を通して M 中間体の構造研究を行う

という方針の下に研究を進めた。

ジエチルエーテルを用いた処理、長鎖アルキル脂肪酸塩を用いた処理、低温下で M 中間体を蓄積する方法等、幾つかの M 中間体安定化の処方が知られていた。しかし、本研究での X 線回

折測定により、その何れもが紫膜の結晶構造に変調をきたしてしまうことが確認された。このため、紫膜の結晶構造や光反応サイクルに影響を及ぼさない M 中間体安定化のための処理を独自に検索した。試行錯誤で、様々な薬剤の効果を調べた結果、アルギニンを用いた処理が M 中間体の安定化に非常に有効であることを見いだすことができた。この処理は、アルカリ性 (pH 8 以上) のアルギニン溶液に紫膜を懸濁し、その溶液を乾燥させるという至って単純な処理方法である。この処理を施した紫膜では、

- ①紫膜, bR の構造に変調を来す事なく
- ②室温, 光照射下で, M 中間体をほぼ100%蓄積できる (図 3)

という効力を持つことが、分光測定, X 線回折実験から明らかにされた。分光測定を通して、アルギニン処理した紫膜では、M 中間体の寿命が、未処理の場合に比べて10万倍に延長されていることが明らかとなり、今後、アルギニン処理が、M 中間体の構造研究に威力を発揮するものと考えられた。又、アルギニン処理の pH 依存性を調べることによって、bR 中のチロシン残基が、M 中間体の寿命延長に影響を及ぼしていることが明らかになった。更に、アルギニン類似体を用いた参照実験からは、アルギニンのグアニジウム基と bR 内の負電荷を有したアミノ酸残基側鎖の相互作用によって寿命延長効果もたらされていることが示された。

以上のような特徴を有したアルギニン処理紫膜試料に対して、粉末 X 線回折実験を行い M 中間体での構造変化を検討した。

X 線回折実験では、紫膜の格子定数が大きく位置分解能の高い回折カメラが要求され、又、M 中間体での強度変化を十分な統計精度で検出するために強力な X 線源を必要とした。このため、X 線回折実験は高エネルギー物理学研究所放射光実験施設の BL-15A に設置される筋肉回折計を用いて行った。光照射下で M 中間体を十分に蓄積したアルギニン処理紫膜からの X 線回折プロファイルと未照射のプロファイルの間には、小さいながらも有意な変化を見いだすことができた (図 4)。例えば、(11), (40), (41), (61) 等の反射では、M 中間体蓄積時に回折強度の減少がみられ、(20), (21), (32), (42), (51) 等の反射では、強度の増加がみられた。又、紫膜の格子定数が M 中間体蓄積時に、約 0.1 Å 増加していることも明らかにされた。これらの結果は、M 中間体形成時に bR 内に何等かの構造変化が誘起されていることを強く示唆するものであり、特に、面間隔が 10 Å 程度の反射に強度変化が集中していることから、M 中間体形成時には、bR を構成している α -ヘリックスに何等かの変位が生じているものと推察された。この変化は、異なる試料に対する測定でも十分な再現性を持って観測することができた。時間分割測定によっては、M 中間体からトランス bR への戻り反応を追跡し、紫膜の結晶性が低下する事なく、M 中間体からトランス bR への戻り反応が進行していることを明らかにすることができた。

粉末回折測定で得られたプロファイルから各反射での強度変化の定量的評価では、検出器特有の効果を考慮すると共に、紫膜のような二次元結晶特有の回折プロファイルからの強度算出方法についても検討を加えた。後者の場合には非対称なプロファイルをフィットすることので

きる関数を導入し、二次元結晶に特有な反射プロファイルの高角側でのテイリングが強度算出にどの様に影響しているかを検討することができた。又、試料中の紫膜の配向度合についても、紫膜に対する電子回折測定の結果を元にして、その評価方法を考案した。複数の処理を経て得られた M 中間体での各反射の強度は、粉末回折プロファイルと同じく、面間隔が10 Å程度の反射において顕著な変化を示しており、その変化量は、トランスの場合の10%程度という小さなものであった。しかし、M 中間体を蓄積した紫膜からの反射強度の定量的評価によって、M 中間体の回折学的な同定を可能としたことは、本研究の大きな成果であると言える。

算出された反射強度を元に、M 中間体での構造変化部位を推定することを目的として、差フーリエ解析、R 因子を指標としたモデルシミュレーションを行った。差フーリエ解析では、多重度12の反射の強度分離比をトランス bR の場合と同じくするという仮定を行い、M 中間体での構造因子の算出を行った。得られた差フーリエ地図には、ヘリックス B, G の周辺に電子密度の増減がみられ、M 中間体形成時にこれらのヘリックスが変位している可能性が示唆された(図5)。M 中間体での強度変化が、面間隔10 Å付近の反射に集中していたことから、モデルシミュレーションでは、各 α -ヘリックスに4方向の変位を仮定したモデルを作製し、そのモデルが与える強度と M 中間体からの実測強度を比較することによってモデルの是非を判定した。この場合にも、差フーリエ解析において得られた B, G の α -ヘリックスが変位する場合のみ、実測強度とモデルの与える強度の間に良い一致がみられた。

近年、遺伝子工学の導入によって bR がプロトン輸送機能を発現するために無くてはならないアミノ酸残基(アスパラギン酸)が同定されており、それらは、 α -ヘリックス C, G に存在することも明らかにされている。本研究で推測された M 中間体での構造変化は B, G ヘリックスで発生しており、両研究の結果から、M 中間体形成時に α -ヘリックス B, C が変位することによって、B, C, G で囲まれた領域にプロトン輸送のためのリレーポテンシャルが形成されている可能性が強く示唆された。

MAX : 11.617
MIN : -7.528
DIV : 10

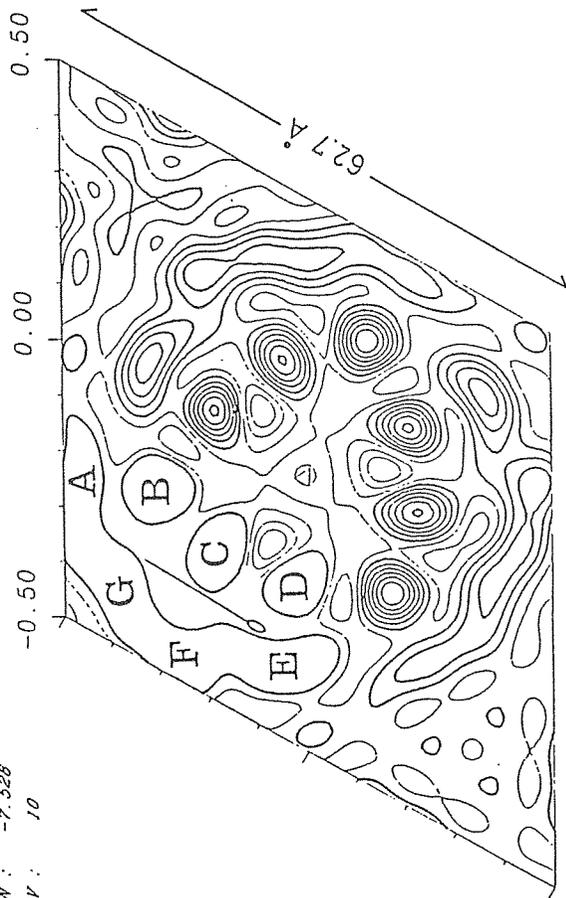


図1 紫膜単位格子中の電子密度投影図 (バクテリアアの細胞質側よりの投影)

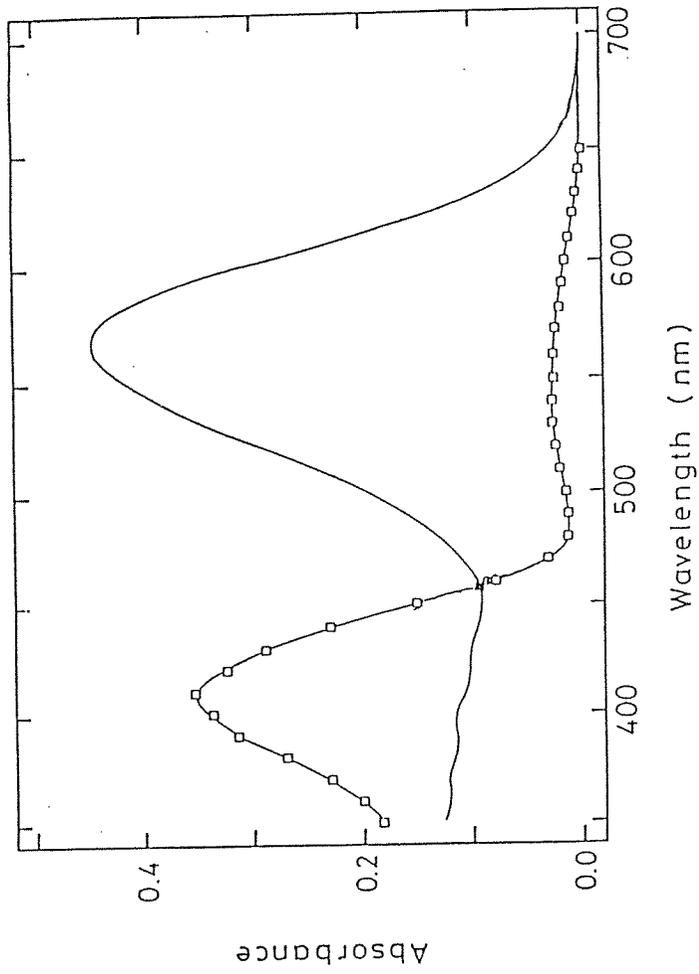


図3 アルギニン処理紫膜の可視領域吸収スペクトル。
 [—: トランス bR, □—□: 光照射下 (M 中間体)]

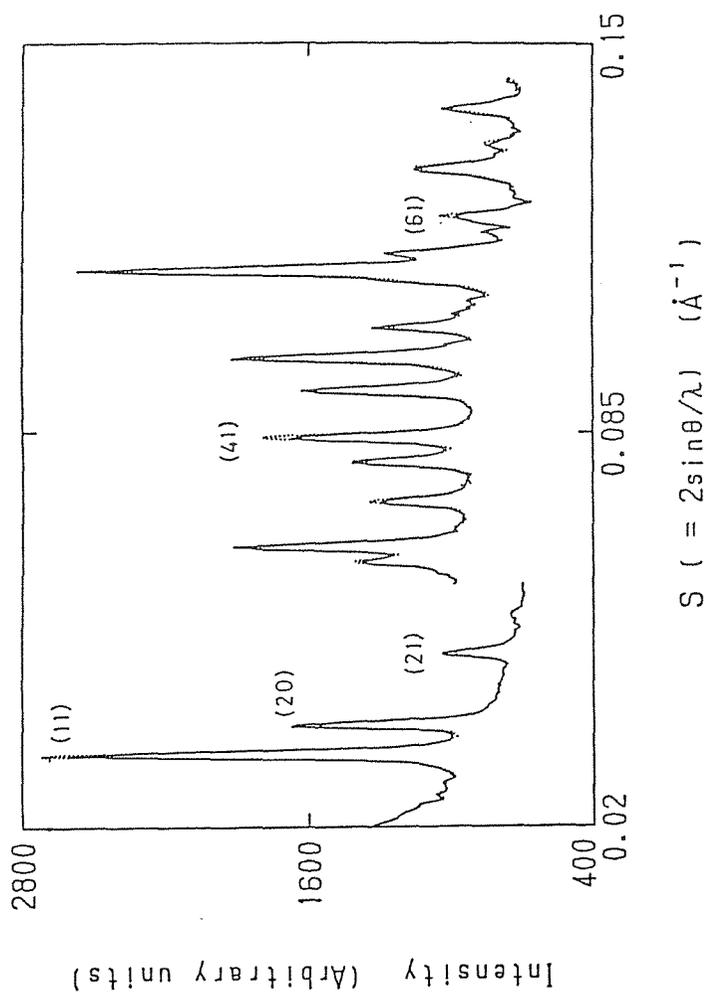


図4 アルギニン処理紫膜からの X 線回折プロファイル
 [実線：M 中間体，破線：トランス bR]

MAX : 0.763
 MIN : -0.755
 DIV : 10
 ERR : 0.166
 TOT : 234.633



図5 [M-トランス] 差フーリエ地図
 [太線：M 中間体で電子密度が増加する領域，細線：電子密度が減少する領域]

論文審査の結果の要旨

中迫雅由君提出の論文は、高度好塩菌の形質膜上に産生される紫膜を形成しているバクテリオロドプシンを抽出し、このバクテリオロドプシンが光反応によって M 中間体と呼ばれる反応中間体のプロトンの脱着現象に伴って生成されることが知られているが、この構造についての知見が、その M 中間体の寿命が数10ミリ秒に止まることから困難であった。中迫君は系統的な実験によってこの M 中間体を少なくとも破壊しないか、もしくは光を消した後で元に戻ることや反応が復元することを前提にした M 中間体の安定的固定法を見つけ出した。これは pH 9.6 以上のアルギニンをできるだけ薄い量、添加することであるが、この方法によって、M 中間体の寿命は約 10^5 位延長することに成功した。M 中間体固定の成功に支えられて、以後光照射前後におけるアルギニン処理バクテリオロドプシンに対して、X 線回折実験を行なって、M 中間体形成時にバクテリオロドプシン内に誘起される構造の変化を調べ、その結果バクテリオロドプシンを形成している 7 つの α ヘリックスの内、内側 3 本の一つと 4 本が束になった内の一つとが少なくとも他の 5 本に比べて明らかに変形することを示唆する構造変化を発見した。この立体構造モデルは X 線回折と電子顕微鏡のデータを組み合わせたものではあるが、他の性質をも説明する妥当性をも含む重要な結果である。

この実験には放射光施設の高輝度 X 線ビームの筋肉小角散乱装置を使ったものであり、中迫君は高度な物理実験技術も修得しており、例えば時間分割 X 線回折実験によって、M 中間体がバクテリオロドプシンに戻ってゆく過程で、紫膜の結晶構造を損うことなく光反応が進行することを明らかにした。

以上、この論文は世に初めて M 中間体の立体構造を示したものであり、博士論文として高度な内容を備えている。中迫君が自立して研究活動を行なうに必要な高度な研究能力、学識も兼ね備えていることも実証した。

よって、中迫雅由君提出の論文を東北大学理学博士の学位論文として合格と認める。