

平成22年 4月30日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20770126
 研究課題名 (和文) 光駆動水素イオンポンプの水素原子の観測
 研究課題名 (英文) Observation of hydrogen atoms of light-driven proton pump
 研究代表者
 岡 俊彦 (OKA TOSHIHIKO)
 静岡大学・理学部・助教
 研究者番号：60344389

研究成果の概要 (和文)：

膜蛋白質バクテリオロドプシンの水素原子の位置も含めた構造決定のために必要な、巨大結晶の作成を試みたが、十分な大きさの結晶の作成は研究期間中に得られなかった。しかしバクテリオロドプシンの結晶化に対して脂質の構造変化が影響していることが示され、脂質中の膜蛋白質結晶化のメカニズムの一端が示された。

研究成果の概要 (英文)：

I tried to make a large crystal of a membrane protein, bacteriorhodopsin, which is enough to decide detailed structure including the positions of hydrogen atoms. But I could not make a large crystal during this research period. On the other hand, it has been revealed that structural transition of lipids effects to the crystallization of bacteriorhodopsin, which is an important aspect of crystallization mechanism of membrane proteins in lipids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：膜蛋白質、巨大結晶化

1. 研究開始当初の背景

膜蛋白質は生体内において非常に重要な役割を担っているものが多く、生命システムを考える上では非常に重要な研究対象である。蛋白質一般に構造情報を得ることは、機

能に関わるアミノ酸などの配置を理解し、反応過程での変化を考える上で基本的な必須情報である。にも関わらず膜蛋白質は結晶化に成功しているものが少ないため、反応機構に必要な構造情報がまだまだ少ない。しかし

構造情報を得られたからと言って、反応機構が完全に理解できるわけではない。構造に足場をおいた、さらなる研究が必要な場合もある。

構造情報を得ることが難しい膜蛋白質のうち、バクテリオロドプシンは構造の解明が進んでいる膜蛋白質である。これまでにX線結晶構造解析により 1.55 Å の空間分解能で構造が明らかにされている。このバクテリオロドプシンは光を吸収することにより水素イオンを能動輸送し、膜の内外で濃度勾配を作り出す。この膜蛋白質は細胞における能動輸送メカニズムという大きな生物学上の問題を解明するためのモデル系として精力的に研究が行われており、もっとも研究の進んでいる膜蛋白質のひとつに上げられる。バクテリオロドプシンの立体構造はこの研究の進んだ蛋白質の反応機構に一層の理解を与えると見えたが、その反応機構の土台から揺るがず疑問を浮上させた。構造解析を行った研究者の一人が彼らのデータを踏まえて「水素イオンが輸送されているのではなく、水酸イオンが輸送されている」と主張した (Luecke H., *Biochim Biophys Acta.* (2000) 1460, 133-56.)。現在までにこの主張に明確に答える解はなく、多数の研究者に受け入れられたとは言いがたい。さらには別の構造解析を元に、「水素イオンと逆方向に水も輸送されている」との主張も現れた (Kouyama *et al.*, *J. Mol. Biol.* (2004) 335,531-546)。立体構造が判明した結果、バクテリオロドプシンが何を輸送するかという根本的な部分でのコンセンサスがなくなってしまうことになる。この原因の一つには輸送される対象となる水素イオンをX線結晶構造解析では観測することができないことがある。周辺の環境から判断して、水素イオンがそこに存在すると考えるわけであるが、実際の位置を確認することはきわめて重要である。

2. 研究の目的

X線結晶構造解析技術の進歩により、水溶性の蛋白質だけでなく、膜蛋白質の原子構造の解明が進むようになった。しかし分解能を上げてもX線では水素原子の位置を決定するのは困難である。一方で中性子結晶構造解析は水素原子の位置を決定しやすいものの、巨大な結晶を必要とするため、膜蛋白質での解析は困難である。そこで中性子結晶構造解析が可能なバクテリオロドプシンの巨大結晶作成を目的とした。

膜蛋白質バクテリオロドプシンは、高度好塩菌の細胞膜上に存在し光を吸収することにより膜の内外に水素イオンの濃度勾配を作り出す。この光駆動水素イオンポンプ機構においてバクテリオロドプシン内部の各残基の水

素原子が大きな役割を果たす。このため水素原子を観測することが可能となれば、バクテリオロドプシンの反応機構の理解が一段と進むことは間違いない。

膜蛋白質は結晶化が難しい上、1辺が1mm以上の巨大結晶となるとなおさらである。バクテリオロドプシンは、一般にはプロトン(水素イオン)を輸送するプロトンポンプと考えられている。このため私の研究の最終目標は「プロトンポンプのプロトンを見る」とも要約できる。輸送される対象を実際に「見る」(観測する)ことは非常に重要なことである。

3. 研究の方法

(1) 膜蛋白質のバクテリオロドプシンの結晶化は脂質であるモノオレイン中で行った。この手法では、膜蛋白質バクテリオロドプシンの可溶化、可溶化バクテリオロドプシンと脂質モノオレインの混合と結晶化剤溶液の添加からなる。これらの手順を高品質巨大結晶作成にむけ更なる検討を行った。精製法の改良、試薬の変更、モノオレインの含水量の変更、薬品の添加などである。

(2) 巨大結晶作成という目的を達成するためには、基本的な情報の一つとなる結晶生成の場となる脂質の状態を知る必要があると考え、その状態の変化をX線回折実験で調べた。脂質に混合したバクテリオロドプシンに対し結晶化剤を加えることにより、数日から数ヶ月後にバクテリオロドプシンの結晶が生成される。この過程での脂質の相の変化を調べた。

4. 研究成果

(1) 可溶化バクテリオロドプシンの精製の最終段階で限外ろ過による濃縮を行うが、精製過程でのなんらかの問題のために終濃度が充分にあがらないことが多かった。そこで可溶化バクテリオロドプシンの精製手法の改良を行った。一つ目は精製過程において可溶化のさいに超音波破碎を行っているが、この時間を厳密に制御することにより改善が見られた。また二つ目は用いる界面活性剤の製造会社・純度を検討したところ、それまでよりも安定して濃縮できるようになった。可溶化蛋白質の安定した供給は結晶化実験においてきわめて重要であるため、この点での改善は大きい。

つぎに結晶化においてさまざまな薬品の添加を行い、結晶の改善を試みた。特に現在の手法では結晶が多く析出しやすい傾向にあるので、その点の改善を期待してテストを行っ

た。まず薬品添加によるスクリーニングであるが、有意に改善されたと認められるものは無かった。さらに脂質の流動性を高める目的でコレステロールなどを加えて影響を観測したが、無添加の状態と比べて顕著な変化は見られなかった。

これ以外にもいくつかの試みを行ったが、現在までに明確に高品質巨大結晶作成に対して有効であるという条件は見つけられていない。またバクテリオロドプシンと混合したモノオレインが白濁する、つまり立方相でなくラメラ相になる現象が多く見られるようになっている。この原因究明を試みているものの、まだ確定的な原因を把握しきれていない。上記の問題点を打破するために継続して、研究を行っていく必要があると考えている。またここで得られた結晶化法の改善を今後の研究に活用していくことができる。

(2) 脂質に混合したバクテリオロドプシンに対し結晶化剤を加えることにより、数日から数ヶ月後にバクテリオロドプシンの結晶が生成される。この過程での脂質の相変化をX線回折実験で調べた。

この結果、脂質も結晶化剤の影響で変化することが明らかになった。バクテリオロドプシンの濃度が低い場合、結晶化剤を添加することにより脂質の相構造がラメラ相から立方相に変化した。これは可溶化バクテリオロドプシンとモノオレインを混合する際に、モノオレインが水分を十分に確保できないためと考えられる。しかしモノオレインに対してバクテリオロドプシンの濃度が高い場合には、ラメラ相のままであった。このことからバクテリオロドプシンの存在がモノオレインの相をラメラ状態に安定化していると考えられる。結晶化のさいにバクテリオロドプシン濃度が高い場合に不透明の相になっているという顕微鏡での観測結果と一致する。

また相の変化と添加する結晶化剤の濃度依存性の関係については、結晶化剤の濃度が高いほど相の移行が早くなる傾向があった。

さらに立方相に変化したものは、一月以上のゆっくりとした速度で格子定数を減少させていくことが分かった。この現象はバクテリオロドプシンを添加しない場合にも観測されたのでモノオレイン固有の性質であると考えられる。ただしバクテリオロドプシンの添加時に比べて、格子定数が明らかに小さくなっていた。これはバクテリオロドプシンの存在がモノオレインの安定な格子定数の小さい立方相の移行に影響を及ぼしていることを示唆する。

また格子定数の変化と添加する結晶化剤の濃度依存性の検討も行ったが、有意な差は確認できなかった。ただし前述の相の移行の差が観測できた場合は、差が認められたが、相の移行の時間差により差ができたためとも考えられる。この点に関してはさらに検討が必要である。

上記の測定の中でバクテリオロドプシンの結晶化は確認されたが、結晶化剤の濃度が2.0M以上で、モノオレインが立方相であるときのみであった。また結晶化剤濃度が下限に近いほど析出される結晶の数が少なく、大きくなる傾向が見られた。これはこれまでの観測結果と一致する。

上記の結果からバクテリオロドプシンの結晶化の過程でモノオレインの相構造および格子定数に変化が見られた。とくに格子定数の変化に関してはこれまで言及されたことの無い変化である。

今後さらに研究を進めて、結晶化のメカニズムに果たす脂質の役割をエネルギー的な側面も含めてよりはっきりとさせたいと考えている。特に脂質の格子定数の変化に関しては重要であると考えており、その速度を制御する手法を探す必要がある。そしてバクテリオロドプシンの高品質結晶、巨大結晶の作成に結び付けていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計1件)

“Structural transition of bacteriorhodopsin revealed by microsecond time-resolved X-ray diffraction study of purple membrane.”

Toshihiko Oka, Katsuaki Inoue, Mikio Kataoka, Naoto Yagi

IUCr2008 Satellite Meeting on Powder Diffraction on Proteins.

September 1-2, 2009 Kyoto, 京都工芸繊維大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 俊彦 (OKA TOSHIHIKO)

静岡大学・理学部・助教

研究者番号：60344389

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：