

学位論文題名

Photometrical Studies on Molecular Motion of
Bacteriorhodopsin during Light Energy Conversion Process(光エネルギー変換過程におけるバクテリオロドプシンの
分子運動に関する分光学的研究)

学位論文内容の要旨

生体内で行われる多種多様な生命現象を担っているのは蛋白質である。したがって、生命現象を理解するうえで蛋白質の機能発現のメカニズムを知ることは重要な意味を持っている。

蛋白質を作っているのはたくさんのアミノ酸が重合した単なる鎖であり、鎖内の各部分部分に働く分子内相互作用により折り畳まれて立体構造を形成するに至る。そのため、蛋白質の機能は立体構造形成によって初めて実現されるにもかかわらず、構造自体は本来動的であり変わりうるものとなっている。したがって、この構造は熱的な変性を受けやすい。しかし、蛋白質は自らの構造が変わりうるという性質を利用して、機能を発現する際に不可欠な過程である「構造変化」を実現している。このような構造の可変性は人工的な機械とは明らかに異なる性質である。したがって、蛋白質の機能のメカニズムを解明するうえで、さらには工学的な応用を目指すうえでも、その動的な性質—特に機能を発現する際に起こす動的な性質に関する知見を得ることは重要である。本研究は蛋白質として光エネルギー変換膜蛋白質あるバクテリオロドプシンをとりあげ、レーザーフォトリシスと吸収偏光解消法を用いて、この蛋白質が機能を発現する際に膜内で起こす挙動の検出を目指したものである。

バクテリオロドプシン (bR) は高度好塩菌の体表に存在する紫色の膜領域—紫膜—に含まれる唯一種の膜蛋白質であり、光エネルギーを用いてプロトン (H^+) を一定の方向へ(細胞の内側から外側へ) 輸送する機能を持っている。この蛋白質を用いる利点は主に二つある。一つは蛋白質の精製は一般に困難であるが、紫膜の場合はそれが容易に行え、かつbRは紫膜内で熱的に非常に安定で取り扱いが容易であること。もう一つはbRはレチナールという色素を内在しており、蛋白質が機能を発現する際にこの色素の色が変化することである。この二つ目の性質は吸収偏光解消法を用いるうえで重要な性質である。レチナールが光で励起されるとbRは構造の異なる幾つかの中間体を経由して元に戻る光化学サイクルを行い、この間に一個のプロトンを輸送する。レチナールの色の変化は中間体の形成と崩壊に対応している。吸収偏光解消法で検出すべき信号はプローブ分子の吸収変化である。したがって、蛋白質運動を測定する場合、一般に蛋白質にプローブ分子を結合させる化学修飾が必要であるが、bRの場合はレチナールを天与のプローブとして利用することができる。

吸収変異解消法によるbRの紫膜内での運動測定に関する報告はこれまで幾つかなされてきたが、光化学サイクル中のbRの運動の変化、さらには紫膜内での回転運動さえも観

察されていない。b Rは紫膜内で三量体を成し、六方格子状に規則正しく配列している。したがって、b Rの運動の皆無はこの結晶状の膜構造によると考えられてきた。しかし、プロトンポンプとしての機能を果たすために確かにb Rは構造変化を起こしているはずである。このことは、堅い膜である紫膜を柔らかくできたならb Rが機能と関連した挙動を起こし始める可能性を示唆している。よって本研究では4、5章で示すように擾乱を加えた紫膜内でのb Rの分子運動を測定している。

本論文は8章構成である。

第1章では本研究の背景及び目的として、生体のもつ大きな特長の一つである「やわらかさ」に触れ、その中で働く蛋白質の動的性質とその機能達成のメカニズム解明の重要性について述べた。

第2章はb Rについての解説である。この蛋白質の機能と構造、さらに光化学サイクル中に起こる蛋白質内でのプロトンの受渡について最近までの知見をまとめて記した。

第3章は偏光解消法について解説した。b Rの運動の測定に用いているのは吸収の偏光解消法であるが、中間体間(M、O中間体)及び基底状態b R間の吸収スペクトルの重なりのため、そこで計算される異方性はやや複雑な情報を含んでいる。このため、より単純な場合である蛍光の偏光解消法について異方性の定義からその物理的な意味を解説し、蛍光の場合の延長として吸収の偏光解消法を取り扱った。

第4章と5章では先に述べたように擾乱を与えた紫膜内でのb Rの分子運動測定を記した。擾乱として4章では紫膜の懸濁液に生体膜の構造に影響を与えるものとして知られているエタノールを添加し、5章では菌の培養温度を変更した。大腸菌やテトラヒメナで知られているように細胞は環境の温度に適応して膜の流動性を変化させる。したがって、菌の培養温度の変更は紫膜への擾乱と成りうるはずである。得られた異方性はエタノール濃度を増すほど、あるいは培養温度を上げるほどb Rの膜内での運動が顕著になること。しかも、基底状態b Rの角度分布がある方向に偏するという奇異な現象が起こることを示していた。この結果は光反応サイクルに入っている分子の運動が束縛されることを示唆している。

第6章は4、5章で得た示唆—光励起された分子の運動は束縛される—を確認することを目的として行った変異b R、D96N変異b R(96番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換している)の分子運動測定結果を記した。4、5章で用いた野生株b Rにおいてデータ解析を困難にしている要因は、1) 中間体間及び基底状態b R間で吸収スペクトルが重なっていることと、2) 基底状態b Rには運動を区別すべき2種類のb R、励起されなかったb Rと励起されて再び基底状態に戻ってきたb Rが混在していることである。D96N変異b RではM中間体の寿命が野生株b Rの場合より非常に長くなるため適当な時間領域では存在する種をM中間体と励起されなかったb Rの2種類だけとみなすことが可能となる。D96N変異b Rを用いることで確かにM中間体の運動が励起されなかった分子の運動より遅いことが明かとなった。

第7章は全分子(中間体と基底状態b R)についての異方性を取り扱っている。4、5及び6章で得られた「励起された分子の運動は束縛される」という結果は、紫膜懸濁液への線偏光した励起光の入射を切っ掛けとして全分子についての吸収モーメントの角度分布が励起光の偏光方向に向かって偏っていくことを示している。すなわち、自己組織的な配向が起こることを意味している。第7章ではこの様子を明確に示すために6章で得たデータを元に全分子についての異方性を算出した。

第8章では本研究の結果を要約し全体にわたる考察を行っている。励起された分子の運動の束縛は中間体における蛋白質の外形が変化するような構造変化に起因しているはずである。しかし、そのような構造変化が起こっただけでは分子の回転速度が変化することは説明できない。したがって、構造変化を起こすことで隣接する蛋白質との相互作用が誘起され、この相互作用が運動を束縛していると考えられる。

b Rのようにレチナルを色素としてもつ蛋白質は動物界では光センサー蛋白質—ロドプシン—として広く分布している。このようなセンサー蛋白質は光情報を自らの構造変化

に変えて他の蛋白質に伝えているはずである。したがって本研究で得られた光励起による蛋白質の構造変化と蛋白質間の相互作用はレチナール蛋白質が本来有している動的性質であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 下 澤 楯 夫
副 査 教 授 武 笠 幸 一
副 査 教 授 狩 野 猛
副 査 助 教 授 荒 磯 恒 久

学 位 論 文 題 名

Photometrical Studies on Molecular Motion of Bacteriorhodopsin during Light Energy Conversion Process

(光エネルギー変換過程におけるバクテリオロドプシンの
分子運動に関する分光学的研究)

細胞の諸機能が発現される過程において中心的役割を演じる生体膜は、機能発現を直接担うタンパク質と、機能発現の場を作る脂質二重層膜を主な構成成分としている。タンパク質は機能を発現する上でコンフォメーションを変化させ、また脂質二重層膜は流動的性質をもってそれを支えている。従って、生体膜の機能発現のメカニズムを理解し工学的応用を可能とするためには、このようなタンパク質及び脂質類の分子運動の特徴を知る必要がある。

本論文は、光を吸収してプロトンを輸送するバクテリオロドプシン(bR)の光エネルギー変換機能を取り上げ、レーザーフォトリシスと吸収偏光解消法により脂質二重層膜内でのタンパク質の回転運動を計測したものであり、その主要な成果は次の点に要約される。

- ① 常法により培養された *Halobacterium Salinarium* から調製された紫膜中のbR分子は膜中での回転が抑制されているが、紫膜懸濁液にエタノールを添加して膜構造に擾乱を与えると、bR分子の膜中における回転運動が観測された。
- ② 膜構造に対する擾乱として培養温度を上昇させることにより、エタノール添加と同様に紫膜中のbR分子の回転が観測された。
- ③ 上記①及び②について、吸収偏光の時間変化を詳細に解析した結果、bR分子の回転は光励起されなかった分子のみに見られ、光励起された反応中間体の回転はむしろ抑制されていることが結論された。
- ④ 反応系を単純化するため、光励起状態で反応の進行が止る性質を持つ突然変異株(D96N)を用いて同様の測定を行い、光励起状態におけるbR分子の回転が抑制されることを直接確認した。
- ⑤ 以上の結果から、レチナールを補欠分子団として持つ光エネルギー変換タンパク質が、光励起状態におけるコンフォメーション変化に伴いタンパク質間の相互作用を変化させる普遍的性質を持つことを結論づけた。
- ⑥ 上記の性質の応用例として、紫膜は超短パルス光の偏光特性を数100msecにわたり記憶する性質があることを見出した。

これを要するに、著者は、バクテリオロドプシンの光励起によるコンフォメーション変化に伴うタンパク質間の相互作用変化の存在を明らかにし、レチナール型光感受性タンパク質の構造と機能の関連に新たな特徴を見出したものである。本研究の成果は、バクテリオロドプシンをバイオエレクトロニクス素子に応用する上で有益な新知見を得ており、生体工学の進歩に寄与するところ大である。

よって著者は、北海道大学博士（工学）の学位を授与される資格あるものと認める。