

膜タンパク質バクテリオロドプシンの 構造安定性に関する研究

学位論文内容の要旨

タンパク質の立体構造に関する研究はタンパク質の研究全体の中でも非常に重要な位置づけにある。しかしながら膜タンパク質は、物質輸送や情報伝達といった重要な機能を持つにも関わらず、立体構造に関する研究が遅れている。そのためアミノ酸配列からの膜タンパク質の構造予測が盛んに行われているが、構造予測に先だって、構造既知の膜タンパク質をモデルとした構造形成メカニズムの解明が急務である。膜タンパク質バクテリオロドプシンはその良いモデルとなり得る。

光駆動プロトンポンプであるバクテリオロドプシンは7本の膜貫通ヘリックスを持つ典型的な膜内在性タンパク質で、高度好塩菌*Halobacterium salinarum*の紫膜上に三量体を単位とした二次元結晶を形成している。高解像度の立体構造回折像が報告されており、機能サイクル中における光中間体の荷電状態やプロトンポンプ経路に関する多くの情報が得られている。

タンパク質の立体構造を調べるには多くの方法があるが、タンパク質の変性実験は立体構造形成や立体構造安定性に働く相互作用を調べるのに有効である。バクテリオロドプシンのアルコールを用いた変性実験ではヘリックス-ヘリックス間の極性相互作用の効果が、界面活性剤を用いた可溶化変性実験ではタンパク質-タンパク質間の相互作用の効果が議論できる。さらに、発色団レチナールをリガンドとして有するため、立体構造の変性を吸収スペクトル測定で、二次元結晶構造やレチナールとタンパク質との相互作用の変化がCDスペクトル測定でそれぞれ観測でき、相互作用の効果を定量的に評価することが可能である。

バクテリオロドプシンの立体構造安定化機構を解明する上で、ヘリックス-脂質膜間、ヘリックス-ヘリックス間、ヘリックス-レチナール間、タンパク質-タンパク質間の相互作用の効果を調べる必要があると考えられる。ヘリックス-脂質膜間の物理化学的相互作用については疎水性相互作用が、ヘリックス-ヘリックス間では膜貫通ヘリックス側鎖間の極性相互作用が主な駆動力あることが明らかにされている。これらに対し、ヘリックス-レチナール間、タンパク質-タンパク質間の相互作用に関してはほとんど知見が得られていない。ヘリックス-レチナール間相互作用に関しては、機能中のレチナールとヘリックスの構造変化や荷電状態の変化がバクテリオロドプシンの立体構造安定性へ及ぼす影響を調べる必要がある。タンパク質-タンパク質間の相互作用に関しては、二次元結晶の崩壊がバクテリオロドプシンの立体構造安定性へ及ぼす影響を調べる必要がある。また、ヘリックス-ヘリックス間の極性相互作用に関わる極性残基の特定も重要な課題として残されている。

そこで本研究では、以下の3つの実験を行い、バクテリオロドプシンの立体構造安定性に対するヘリックス-レチナール間、タンパク質-タンパク質間に働く相互作用の効果を考察した。さらに、ヘリックス-ヘリックス間に働く極性相互作用に関与する残基についての考察を行った。

1) 可溶化バクテリオロドプシンの光誘起変性

機能中のバクテリオロドプシンの立体構造安定性を調べ、ヘリックス-レチナール間に働く相互作用についての考察を行った。オクチルグルコシド可溶化バクテリオロドプシンの光誘起変性現象を利用し、暗中与光照射下における変性挙動を吸収スペクトル測定で調べた。光照射下では暗中に比べて変性速度定数が増加し、変性の活性化エネルギー値は減少した。機能サイクル中にあるバクテリオロドプシンの安定性は基底状態よりも大きく低下していた。このことは、基底状態よりも安定性の悪い光中間体の存在を示唆している。機能サイクル中のレチナールとヘリックスの構造変化や荷電状態の変化が、バクテリオロドプシンの立体構造安定性へ影響を及ぼしていることが示された。

2) バクテリオロドプシンの可溶化過程における構造変化と安定性

バクテリオロドプシンの二次元結晶構造と立体構造安定性との相関関係を調べ、タンパク質-タンパク質間に働く相互作用についての考察を行った。さまざまなオクチルグルコシド濃度でバクテリオロドプシンを可溶化し、二次元結晶構造の崩壊挙動を CD スペクトル測定で調べると同時に、吸収スペクトル測定で光誘起変性挙動を調べた。さらに、ドデシルマルトシドや Triton X-100 による可溶化と光誘起変性挙動と比較した。オクチルグルコシド可溶化バクテリオロドプシンでは、二次元結晶構造の崩壊に伴って立体構造安定性が低下し、さらに光誘起変性現象がドラスティックに起こることが示された。Triton X-100 可溶化バクテリオロドプシンでは二次元結晶構造が崩壊しており、光誘起変性現象が観測された。これに対し、ドデシルマルトシド可溶化バクテリオロドプシンでは二次元結晶構造が保存されており、光誘起変性はほとんど起こらなかった。これらのことから、バクテリオロドプシンの立体構造安定性に対してタンパク質-タンパク質間の相互作用が重要な役割を果たしていることが示された。さらに、二次元結晶の崩壊は光誘起変性を誘導していることから、タンパク質-タンパク質間相互作用は、特に機能中のバクテリオロドプシンの安定性に関与していることが示唆された。

3) バクテリオロドプシン D96N 変異体の立体構造安定性

D96N 変異型バクテリオロドプシンの立体構造安定性アルコール変性実験と可溶化光誘起変性実験で野生型と比較し、Asp 96 がバクテリオロドプシンの立体構造安定性に及ぼす影響について調べた。立体構造安定性は吸収スペクトル測定で評価した。1-プロパノールによる変性実験では、D96N 変異型バクテリオロドプシンで変性臨界濃度が野生型より減少した。オクチルグルコシドで可溶化し、暗中与光照射下での変性挙動の比較を行ったところ、変性速度定数は D96N 変異型の方が増加していた。アルコール変性、可溶化光誘起変性のいずれの実験でも D96N 変異型バクテリオロドプシンで安定性が野生型より低下しており、Asp96 のバクテリオロドプシン立体構造安定性への寄与が明らかにされ、膜貫通ヘリックス間の極性相互作用と関わっている可能性が示された。

本研究では、これまで明らかにされていたバクテリオロドプシンの構造安定化因子であるヘリックス-ヘリックス間の極性相互作用に加えて、ヘリックス-レチナール間の相互作用、タンパク質-タンパク質間の相互作用の重要性を示すことができた。またヘリックス-ヘリックス間の極性相互作用に関与する残基の特定を行うことができた。これらは、膜タンパク質の立体構造安定性や形成機構の解明、ひいては立体構造予測に重要な情報であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	加茂直樹
副査	教授	稲垣冬彦
副査	助教授	宮内正二
副査	助教授	三宅教尚

学位論文題名

膜タンパク質バクテリオロドプシンの 構造安定性に関する研究

膜タンパク質は物質輸送や情報伝達といった重要な機能を持つにもかかわらず、立体構造に関する研究は、水溶性タンパク質ほど進んでいない。この原因は結晶の作製が一般に困難でX線解析が適用できないこと、及び、NMRではアイソトープラベルのための大量発現系が必要であったり、またNMRでの構造決定には分子量が大きすぎたりすることが原因である。一方、膜タンパク質の一次構造からハイドロパシーインデックスを使って膜内貫通ヘリックスを予測することがされており、だいたい正しい予測を与えている。しかし、それ以上の構造の予測は困難であり、脂質の2分子膜という疎水環境で働く分子間力を考え、膜タンパク質の構造を理論的に考察研究が盛んにされている。申請者は、このようなアプローチよりも、膜タンパク質を変性させてみれば、立体構造形成や立体構造安定性に働く因子を明らかに出来るのではないかと考え、本学位論文の研究を行っている。

実験に選んだ膜タンパク質はバクテリオロドプシンである。バクテリオロドプシンは光駆動プロトンポンプであり、7本の膜貫通ヘリックスを持つ典型的な膜内在性タンパク質で、高度好塩菌*Halobacterium salinarum*の細胞膜に存在する。細胞膜上では三量体を単位とした二次元結晶を形成している。この二次元結晶部分は比較的簡単な操作で分離精製でき、バクテリオロドプシンの吸収による紫色をしているので、紫膜と呼ばれている。紫膜にはタンパク質としてはバクテリオロドプシンのみを含んでいる。

申請者は次に述べる3つの実験を行い、バクテリオロドプシンの立体構造安定性を考察している。

1) 可溶化バクテリオロドプシンの光誘起変性

紫膜に光照射をしても変性（バクテリオロドプシンの吸収で判定）は見られなかったが、オクチルグルコシドで可溶化した試料では、光照射によって、暗中よりも変性が加速された。バクテリオロドプシンは、光量子により励起され、種々の光化学中間体をへてもとの基底状態のバクテリオロドプシンに緩和する。従って、申請者が初めて見いだした光誘起変性は、基底状態よりも安定性の悪い光化学中間体が存在することを意味している。

2) バクテリオロドプシンの可溶化過程における構造変化と安定性

種々の濃度のオクチルグルコシド、ドデシルマルトシドおよびTriton X-100でバクテリオロドプシンを可溶化し、二次元結晶構造の崩壊挙動をCDスペクトルでモニターしつつ、光誘起変性挙動を調べた。CDスペクトルより二次元結晶構造が保たれた可溶化サンプルでは、光誘起変性が起こらなかった。以前に、光化学反応の詳細な解析から、光化学中間体の状態で、バクテリオロドプシンの中間体間の相互作用の存在は推論されていたが、申請者の研究は、中間体における分子間の相互作用を別の面から明らかにしたものである。

3) D96N変異体の立体構造安定性

アルコール変性、可溶化光誘起変性のいずれの実験でも、D96N変異型バクテリオロドプシンで安定性が野生型より低下しており、Asp96のバクテリオロドプシン立体構造安定性への寄与が明らかにされ、膜貫通ヘリックス間の極性相互作用が立体構造安定性に重要であることが示された。

学位論文は日本語で書かれ、6章からなる116ページのものである。申請者の究極の目標はいまだゴールは遠いが、上記のようにバクテリオロドプシンの立体構造安定性に関して、種々の新しい知見を発見しており、薬学博士を授与するに値すると認めた。