

berg-原子価性混合の問題も検討した。これまで、等電子系分子の内殻励起スペクトルはよく似ていると報告されていた。詳細を検討すると C_2 H_2 分子の $C\ 1s \rightarrow 3s$ および $3p$ Rydberg 励起に基づくピーク形状は N_2 および CO 分子のものとは異なることがわかった。これは、 $3\sigma_u^*$ および $4\sigma_g^*$ 原子価性軌道への遷移がイオン化しきい値以下に存在し、Rydberg-原子価性混合が起きているためである。

(6) SO_2 分子の硫黄 K 殻励起状態の対称性

基底状態において屈曲した安定構造を持つ SO_2 分子を対象とし、ARPIS を測定することにより電子状態の対称性を識別可能かどうかについて検討した。その ARPIS 測定では、検出器の前段にかけた阻止電場に依存して、2つの原子価性励起後に放出される解離イオンの異方性パラメータが変化する。相対的に大きな運動エネルギーを持って放出される解離イオンの多くは O^+ イオンである。 O^+ イオンの角度分布は電子状態の対称性を反映することに基づき、 $S\ 1s \rightarrow 9a_1^*$ と $6b_2^*$ 励起状態とを実験的に識別できることを示した。

(7) 硫黄 K 殻励起されたチオフェン分子の角度分解イオン収量スペクトル

角度分解イオン収量法を5員環平面分子であるチオフェン (C_4H_4S) 分子に拡張した。平面分子に対しては、面外に励起双極子モーメントを持つ遷移と面内に持つ遷移を分離でき、気相中の C_4H_4S 分子の $S\ 1s \rightarrow 4b_1^*(\pi^*)$ と $8b_2^*(\sigma^*)$ 原子価性励起状態を実験的に識別することができた。

本研究では、 N_2O および CO_2 , OCS , CS_2 , C_2H_2 , SO_2 , C_4H_4S 分子の内殻励起スペクトルを高いエネルギー分解能条件で角度分解イオン収量法により測定し、スペクトル構造の起源を明らかにした。新しく得られた知見で特に重要であるのは、振電相互作用および Rydberg-原子価性混合の寄与を考慮に入れた信頼性の高い帰属が与えられたこと、直線分子の $1s \rightarrow \pi^*$ 励起状態における Renner-Teller 効果に基づく変角振動の影響が解離イ

オン放出の角度分布に反映されることである。

文献

- 1) Adachi et al.: *J. Chem. Phys.*, **102**, 7369 (1995).
- 2) Adachi et al.: *J. Electron Spectrosc.*, **79**, 491 (1996).
- 3) Adachi et al.: *J. Phys. Chem.*, **100**, 19783 (1996).
- 4) Adachi et al.: *J. Chem. Phys.*, **107**, 4919 (1997).

(受付番号 97034)

新博士紹介

1. 氏名 柴田直樹 (現: 姫路工業大学理学部)
2. 論文提出大学 大阪大学大学院
3. 学位の種類 博士 (工学)
4. 取得年月 1997年3月
5. 題目 Novel Insight into the Structure-Function Relationship of the Proteins Concerning Photosynthesis

6. アブストラクト

光合成は光エネルギーを化学的エネルギーに変換し、そのエネルギーを利用して化学反応を行うシステムであり、一般には暗反応と呼ばれる二酸化炭素固定反応と明反応と呼ばれる光合成電子伝達反応の2つのプロセスによって成り立っている。暗反応において中心的な役割を担っているのが二酸化炭素/酸素固定酵素、リブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (ルビスコ) であり、大気中の二酸化炭素濃度の維持と農作物の成長に最も重要な役割を果たしている。一方、明反応では光化学系が中心的な役割を果たす。光化学系との電子の受け渡しにはプラスチックタンパク質などの電子伝達タンパク質が関与する。また、最近になって光化学系に類似の機能を果たす色素タンパク質がトキイロヒラタケに見出された¹⁾。光エネルギーを化学的エネルギーに変換する技術は新しいエネルギー開発に向けて重要な研究課題の1つであり、その機能解明が求められている。また、酵素の機能解明のためには今や立体構造に立脚した議論が不可欠であり、これ

らの酵素の構造・機能相関の解明は非常に重要な研究課題である。本研究ではこのような背景のもとに光合成システムに関係するタンパク質において、構造と機能との相関を明らかにするため、X線結晶構造解析を行った。

ホウレンソウと紅藻 *Galdieria partita*²⁾ の2種に由来するルビスコ、色素タンパク質³⁾、アオサプラストシアニンの結晶化を蒸気拡散法によって行った。その結果いずれもX線回折実験に適した結晶を得ることに成功した。ルビスコは分子量約55万ダルトンの巨大分子複合体であり、その結晶はいずれも比較的大きな格子定数をもつ。また色素タンパク質の結晶は針状結晶であり、実験室レベルでの装置では高分解能のデータ測定は困難であった³⁾。いずれの結晶も放射光と巨大分子用ワイゼンベルグカメラを併用することにより、1.6 Å分解能のデータ測定に成功し、原子レベルでの構造解析を行うに十分な分解能のデータ測定に成功した。

ルビスコとプラストシアニンは分子置換法、色素タンパク質は多重同型置換法によって構造解析を行った。その結果、ホウレンソウルビスコは1.8 Å分解能で結晶学的信頼度因子15.9%、プラストシアニンは1.6 Å分解能で17.6%までの構造精密化に成功した。また、色素タンパク質は現在までに2.8 Å分解能での構造解析に成功し、分子モデルの構築が進行中である。

アオサプラストシアニンはβ-サンドイッチ構造モチーフを持ち、銅イオンは分子のほぼ上端に位置する。4つの配位子は歪んだ四面体型配位構造をとる。これまでX線結晶構造解析がなされたものに比べ、Cu(II)-Sδ(Met-92)の距離(2.69 Å)が0.13-0.23 Å短いことが明らかとなった。そこで、4種類のプラストシアニンの立体構造を比較検討した結果、88-92番の残基の構造の差が比較的大きく、それが88番の残基に起因することを突き止めた。最も長いCu(II)-Sδ(Met-92)の距離(2.92 Å)を持つ *E. proliferans* プラストシ

アニンではOγ(Ser-88)とO(Asp-85)間の水素結合が存在するのに対し、アオサプラストシアニンでは88番の残基がアラニンであるためこの水素結合が存在しない(図1)。*E. proliferans* プラストシアニンではOγ(Ser-88)-O(Asp-85)水素結合が88-92番の残基をAsp-85の方に引きつけ、Met-92はCα原子を支点として約12°回転するためにCu(II)-Sδ(Met-92)間の距離が長くなることが明らかとなった。

銅イオンの配位構造はその機能に大きく影響すると考えられているが、アオサプラストシアニンの構造解析の結果は、これまでの定説とは異なり、配位構造が弱い相互作用にも影響を受けることが示唆された。

ルビスコはLサブユニットとSサブユニットが8個ずつ会合したL₈S₈構造をとって機能している。高等植物のルビスコは反応開始数分後に活性が低下する。この現象はフォールオーバーと呼ばれ、活性部位に基質が結合することによる立体構造の変化によって引き起こされることが示唆されている⁴⁾。この現象にはLys-21とLys-305が関与することが報告されている。そこで本研究ではホウレンソウルビスコと反応中間体類似物であるCABPとの複合体の立体構造をもとに、これらリジン残基の構造と立体構造変化との相関について検討した。

Lys-21のアミノ基は8個のLサブユニットのうち半分がAsp-19のカルボキシル基と水素結合を形成し、他の半分はフリーであった。一方、Lys-305は同様に半分のLサブユニットがGlu-93のカルボキシル基と水素結合を形成し、残りはC末端のカルボキシル基と水素結合していた。このことから、2つのリジン残基近傍に、リジン残基が結合するサイトがそれぞれ2カ所ずつ存在することが明らかとなった。このことからリジン残基は結合様式を変化させることにより、活性状態を切り替える役割を果たしているものと思われる。また、中間体類似物を結合していない状態

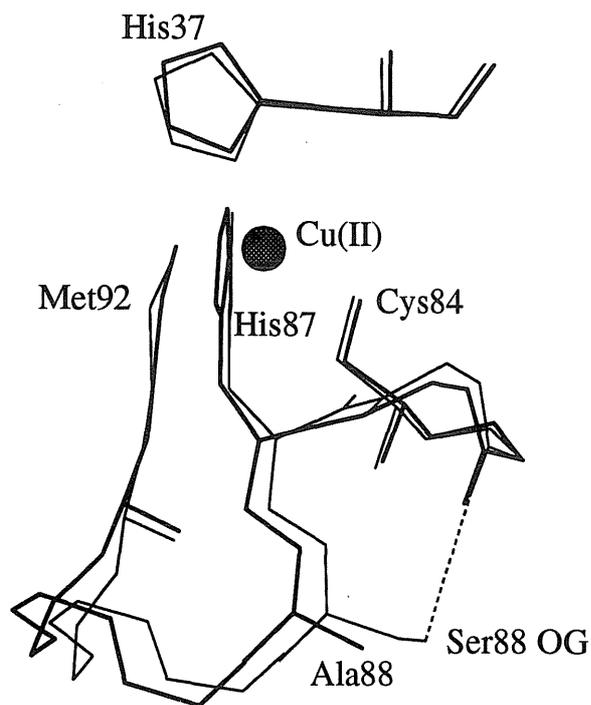


図1 Cu(II)近傍の構造の比較
太線: *U. pertusa* 細線: *E. proliferifera*

とCABPとの複合体との構造を比較すると、活性部位付近ではLys-21近傍の立体構造が大きく変化している(図2)。この構造変化はN末端ドメインが 2° 回転することに起因している。2つのリジン残基はこのドメイン回転を引き起こすものと思われる。

高等植物では、Sサブユニットをコードする遺伝子には複数のコピー(5から13個)が存在し、それらのうちいくつかは互いに異なる配列を持っている。また、それらのほとんどが発現しているため、ルビスコには構造の異なる複数種のSサブユニットが含まれる可能性がある。しかし、これまでの結晶構造解析では、一種類であると報告されてきた。今回の解析の結果、8個のSサブユ

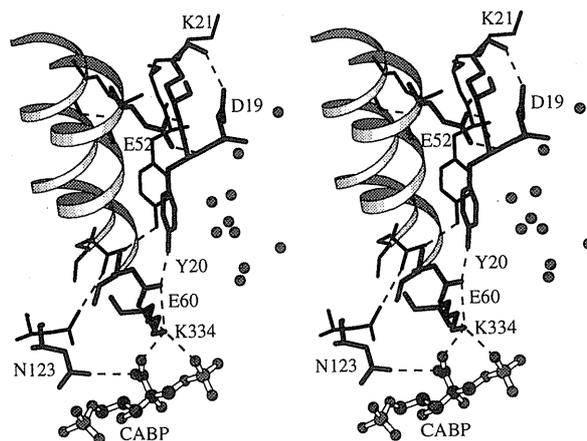


図2 CABP非結合状態(細線)と結合状態(太線)のLys-21及び活性部位付近の構造比較

ニットのうち、56番目のアミノ酸残基が、半分がロイシンであるのに対し、残り半分ではヒスチジンであった。従って、ホウレンソウルビスコは2種類のSサブユニット(S^I , S^{II})を持ち、これまで考えられていた L_8S_8 構造ではなく、 $L_8S_4^I S_4^{II}$ 構造であることが明らかになった⁵⁾。

以上のようなL, S両サブユニットにおけるルビスコの立体構造上のヘテロジェナイティはYokotaらが明らかにした高等植物由来のルビスコ固有の酵素化学的性質⁴⁾と関係している。

文献

- 1) S. Takekuma et al.: J. Am. Chem. Soc., **116**, 8849 (1994).
- 2) N. Shibata et al.: J. Biochem., **120**, 1064 (1996).
- 3) N. Shibata et al.: Acta. Cryst., **D53**, 335 (1997).
- 4) A. Yokota et al.: J. Biochem., **110**, 253 (1991).
- 5) N. Shibata et al., J. Biol. Chem., **271**, 26449 (1996).

(受付番号 97035)