

バクテリオロドプシンの光反応中間体の構造とプロトンポンプ機構

岡 俊彦*, 上久保 裕生**, 片岡 幹雄***

*大阪大学大学院理学研究科, **高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所

***奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究所

Structures of Photointermediates of Bacteriorhodopsin and the Molecular Mechanism of Proton Pump

Toshihiko OKA*, Hironari KAMIKUBO** and Mikio KATAOKA***

*Graduate School of Science, Osaka University

**Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization

***Graduate School of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology

In order to reveal the molecular mechanism of light-driven proton pump by bacteriorhodopsin, the structures of photoreaction intermediates were analyzed with synchrotron radiation X-ray diffraction. Bacteriorhodopsin is composed of seven transmembrane helices (A-G from N terminus). At the M intermediate, the major change is observed around helices B and G, while at the N or the MN intermediate, the major change occurs around helices F and G. The change is related to the opening of cytoplasmic proton channel. Mercury labeling technique is successfully applied to investigate the position and the movement of a specific amino acid residue in the projection map. Time-resolved diffraction experiment is promising to reveal the structural change during photoreaction cycle. The light-induced structural change is triggered by the deprotonation of Schiff base. Based on these results, the model to elucidate the vectorial proton transport is proposed.

1. はじめに

編集委員から依頼された内容は、溶液散乱を用いた蛋白構造研究の手段、有効性などについての解説であったが、既に様々な形で解説¹⁻⁵⁾を書いている。ところで、溶液散乱の他、繊維回折や膜回折など小角部分に構造情報が現れる測定手段を総称して小角散乱と呼んでいる。そこで、小角散乱の一部をなす生体膜回折の応用研究の一例として、我々の研究グループが行ってきているバクテリオロドプシンの光反応中間体の構造研究を紹介することで、責を果たしたいと思う。

バクテリオロドプシン (bR) は、高度好塩菌の細胞膜に存在する光受容蛋白質である。bR は、発色団としてレチナールを含んでおり、568 nm に吸収極大波長を持つ。紫色に呈色しているため、bR を含む膜を特に紫膜と呼んでいる。紫膜は bR と脂質からなり、紫膜中で bR は二次

元六方格子状に配列している。紫膜試料に X 線を照射すると、この配列に起因するブラッグ反射が粉末回折様に観察される (Fig. 1)。2 次元結晶という特質から bR の研究には回折学的手法が盛んに応用され^{6,7)}、現在では、3 次元結晶構造解析もなされている⁸⁾ (Fig. 2)。bR は膜を貫く 7 本のヘリックスから構成されている。N 末から数えて 7 本目の G ヘリックスにあるリジン 216 にレチナールが Schiff 塩基結合している。bR が光を吸収するとレチナールの異性化が起き、その後吸収スペクトルで識別できるいくつかの光反応中間体を経て元に戻るという環状の光反応を行う (Fig. 3)。M 中間体形成時にプロトンが細胞外に吐き出され、N 中間体形成時または形成後にプロトンを細胞質側から取り入れる。プロトン濃度は細胞外の方が高いので、bR は、光エネルギーを利用して、プロトンを細胞外に汲み出す光駆動プロトンポンプ機能を持つことに

* 大阪大学大学院理学研究科 〒679-5198 兵庫県作用郡三日月町三原323-3 高輝度光科学研究センター 実験部門
TEL 0791-58-1812 FAX 0791-58-1814 e-mail oka@spring8.or.jp

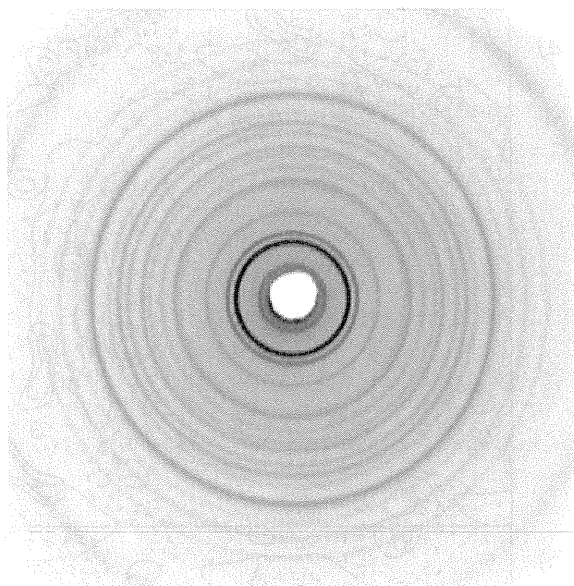


Figure 1. X-ray diffraction pattern of purple membrane taken with CCD detector at BL45XU, Spring-8. Exposure time was 122 msec.

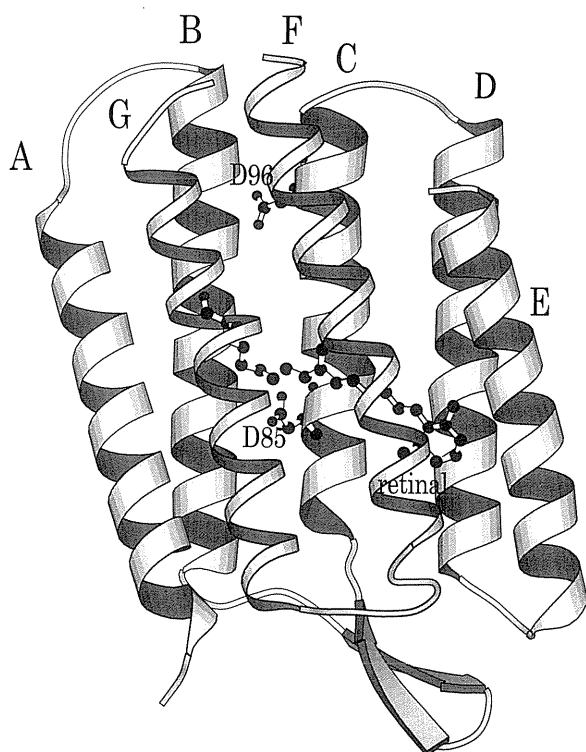


Figure 2. Tertiary structure of bacteriorhodopsin revealed by X-ray crystal structure analysis⁹⁾. The figure was drawn with MOLSCRIPT²³⁾.

なる。細胞膜を介したプロトンの濃度勾配形成は、生体エネルギー変換の基本をなすものである。細胞内外でのイオン濃度差形成は、エネルギー変換のみならず神経興奮など生体情報変換の基本でもある。そして、それぞれのイオン

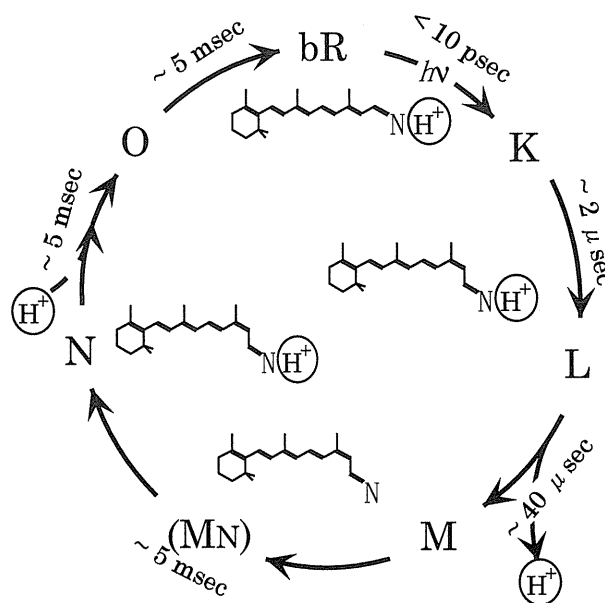


Figure 3. Photocycle of bacteriorhodopsin. The isomer state of retinal and the protonation state of Schiff base are shown with the time constant of each reaction.

についてのイオンポンプが存在している。最も単純なプロトンポンプである bR の光駆動プロトンポンプ分子機構についての研究は、イオンポンプの分子機構の解明に大きく貢献することが期待される。ここでは、我々が明らかにしてきた光反応中間体の構造及び最近の時間分解測定の結果、他の分光学的手法により明らかになっている様々な事実と構造情報から導き出した我々の光駆動プロトンポンプの分子機構のモデルについて解説する。

2. 光反応中間体の構造

光反応中間体の構造を知ることが、プロトンポンプ機構の理解のためには重要であるという観点から、我々は、放射光 X 線回折を用いて、bR の光反応中間体の構造情報を得ようとしてきた。X 線回折を用いて光反応中間体の構造情報を得るためには、二つの方法が考えられる。一つは、何らかの方法で特定の光反応中間体を蓄積しておいて、その状態からの回折像を得る方法であり、いわば平衡論的方法とすることができる。他は、光照射後の回折像を高い時間分解能で追跡することにより光反応中間体の情報を得る方法で、速度論的方法といえる。まず、前者の方法による光反応中間体の構造について述べよう。

紫膜の回折実験は、乾燥配向試料を用いて行う。乾燥フィルムの場合による均一性は制御できないため、光吸収による構造変化を検出する場合には、同じ試料の同じ場所からの回折像を精度よく記録する必要がある。したがって、短時間の内に高精度の回折像を得ることのできる放射光の利用が本質的である。さらに、特定の光反応中間体の構造情報を得るためには、光照射により目的の光反応中間体だ

けが蓄積した状態を実現する必要がある。我々は、プロトンの脱吸着と密接に関連している M 及び N 中間体に着目した。Fig. 3 に示すように、生理的条件下ではこれらの中間体の寿命は数ミリ秒から数十ミリ秒である。生理的条件下で、ただ光を照射するだけでは、特定の光反応中間体を蓄積することはできない。幸い、塩酸アルギニン処理をした紫膜をアルカリ pH にすると、室温で100% M 中間体を蓄積することができた⁹⁾。M 中間体の吸収極大は412 nm にあり、黄色を呈している。したがって、M 中間体の蓄積は試料の色を見ることで確認できる。M 中間体で起きる構造変化を Fig. 4(a) に示す¹⁰⁾。bR を構成する7本のヘリックスの内、B と G の2つのヘリックス周辺で顕著な変化が起きている。次に、F171C 変異 bR が、N 中間体を選択的に蓄積することを見出し、N 中間体の構造解析も行った (Fig. 4(b))¹¹⁾。回折強度プロファイルの変化の様子を Fig. 5 に示す。N 中間体の差フーリエ地図を見ると、F と G で大きな変化が見られているが、B ヘリックスでの変化は小さくなっている。F ヘリックスには顕著な正負一對のピークが現われ、N 中間体において、このヘリックスが傾くあるいは平行移動することを示唆する。ヘリックス B, C, F, G で囲まれた領域に、プロトンポンプ機構で重要な役割を果たすアスパラギン酸85 (D85)、レチナールシッフ塩基 (SB)、アスパラギン酸96 (D96) が存在している。SB を挟んで D96 は細胞質側に、D85 は細胞外側に存在する (Fig. 2)。アスパラギン酸は生理的条件下では通常解離しているが、D96 は暗状態ではプロトン化している。これは、D96 の微環境が高度に疎水的であることを示している。我々は、N 中間体では、F ヘリックスが傾くことにより、細胞質側のチャンネルが開き、D96 の微環境が親水的になり、細胞質側からのプロトンを受け入れやすくしている、と解釈した。平行移動では、同時に細胞外側のチャンネルも開いてしまい、プロトンの逆流を防げないだろうとも考えた。後に、電子顕微鏡像の三次元再構成の手法により、N 中間体での構造変化は、細胞質側のチャンネルで生じており、F ヘリックスが傾くという我々の解釈が正しいことが示された^{12,13)}。

我々とは別に、ドイツのグループが、塩酸グアニジン処理あるいは D96N という変異 bR を用いて M 中間体の構造解析を行っていた。彼らは、F と G に大きな変化を見出していた (Fig. 4(c))^{14,15)}。B と G が変化するという我々の M 中間体の構造とは異なっている。この違いが議論の種になり、我々のアルギニン処理による M 中間体には N 中間体が混在しているという説も出された¹³⁾。しかし、京大のグループは、FTIR の解析から、D96N で蓄積する M 様の中間体ではシッフ塩基は脱プロトン化しているが、蛋白質部分は N 中間体の構造を持つ MN 中間体と呼ぶべきものであることを発見し¹⁶⁾、我々の N 中間体の構造解析がこの結論を裏付けることとなった。

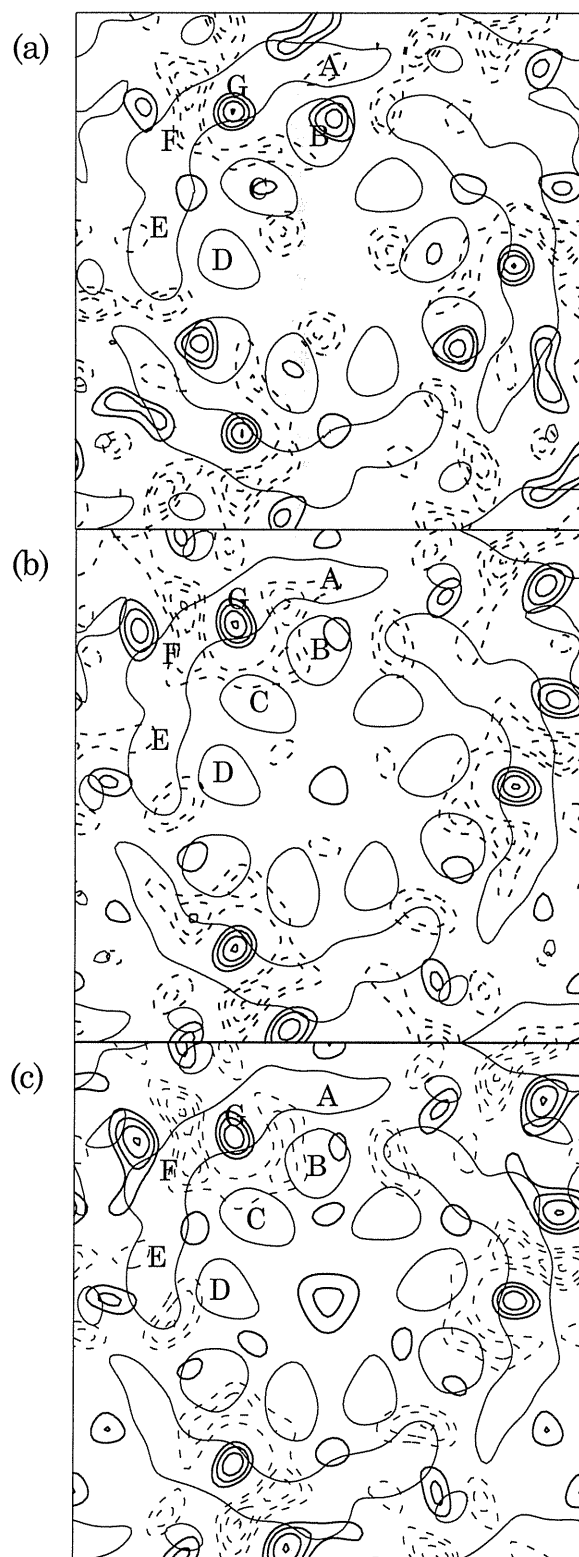


Figure 4. Difference electron density map of photointermediates of bacteriorhodopsin. (a) M intermediate for arginine treated wild type bacteriorhodopsin¹⁰⁾, (b) N intermediate obtained for F171C mutant bacteriorhodopsin¹¹⁾, and (c) MN intermediate obtained for D96N mutant bR. Thick contour lines indicate positive density change where the electron density is increased in the M or N intermediate, and thin contours indicate negative density regions. BR projection structure is superimposed.

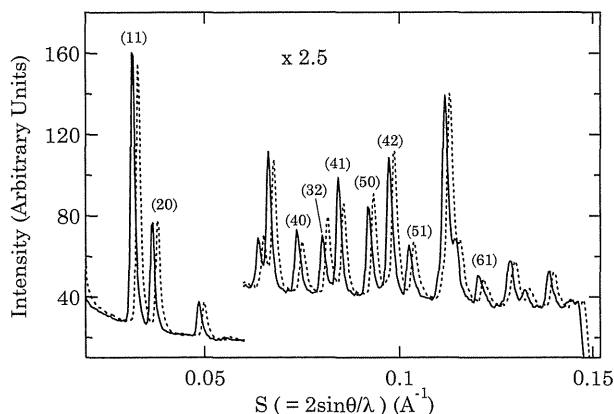


Figure 5. X-ray diffraction profiles of F171C bR¹¹⁾. Solid line indicates diffraction profile in the dark, and broken line is diffraction profile under continuous illumination. Profile by dashed line is shifted to the right for the sake of clarity. Intensities for $S > 0.06$ are multiplied by 2.5.

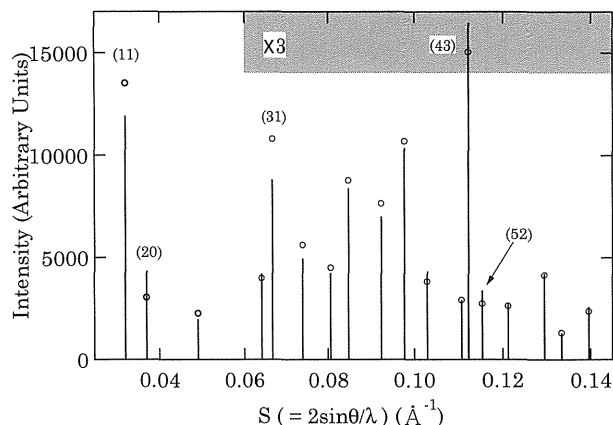


Figure 6. X-ray diffraction intensities of labeled and nonlabeled I222C bacteriorhodopsin¹⁷⁾. The intensities of the labeled sample are indicated with circles. The region of $S > 0.06$ is expanded by a factor of 3. The magnitude of error bar is within a circle size.

3. 重原子修飾の応用による G ヘリックスの変化の詳細な解析

Fig. 4 で示す電子密度は膜面への投影図であるため、変化が細胞質側で起きているのか、細胞外側で起きているのか判定することはできない。反応の起きている側を明らかにし、さらに構造変化をアミノ酸レベルで記述するために、我々は重原子修飾法の応用を考えた。bR の構成アミノ酸にはシステインが含まれていない。そして、システインを選択的に水銀修飾できる。そこで、F27C, L100C, T170C, F171C, I222C の各システイン置換変異体を作成し、それぞれについて、PCMB により水銀修飾した。システイン置換した部位は、全て細胞質側である。まず、重原子置換法の有効性を調べるために、これら変異体で水銀の位置の検出を行い、既に解析されていた構造と比較した。水銀修飾による強度変化の一例を Fig. 6 に示す。差電子密度図には、明瞭なピークが一つだけ見出されたため、水銀の電子密度と判断した (Fig. 7)。さらに、ここで得られた位置を初期値として、精密化を行った (Fig. 7)。こうして 7 Å 分解能の回折データから、水銀の位置を 1 Å 以内の精度で同定することができた。Fig. 8 には、決定された水銀の位置と、bR の立体構造中の対応するアミノ酸を示している¹⁷⁾。水銀は、 δ 位の炭素に対応した位置に結合している。T170を除く全ての置換されたアミノ酸の δ 位の近くに水銀が見出されている。T170には δ 炭素がない。T170C に修飾された水銀は、 γ 位から 1.5 Å 以内の位置にあるが、これは δ 位に許される距離の範囲である。以上の結果、水銀修飾によって、bR の二次元投影電子密度図にアミノ酸を位置づけられることが示された。

我々は、光反応中間体の構造変化の実体を解析するために水銀修飾法を拡張した¹⁸⁾。M 中間体、N 中間体の両者に共通に見出される G ヘリックスの変化の実体は、F や B ヘリックスに比べるとあいまいであったため、G ヘリッ

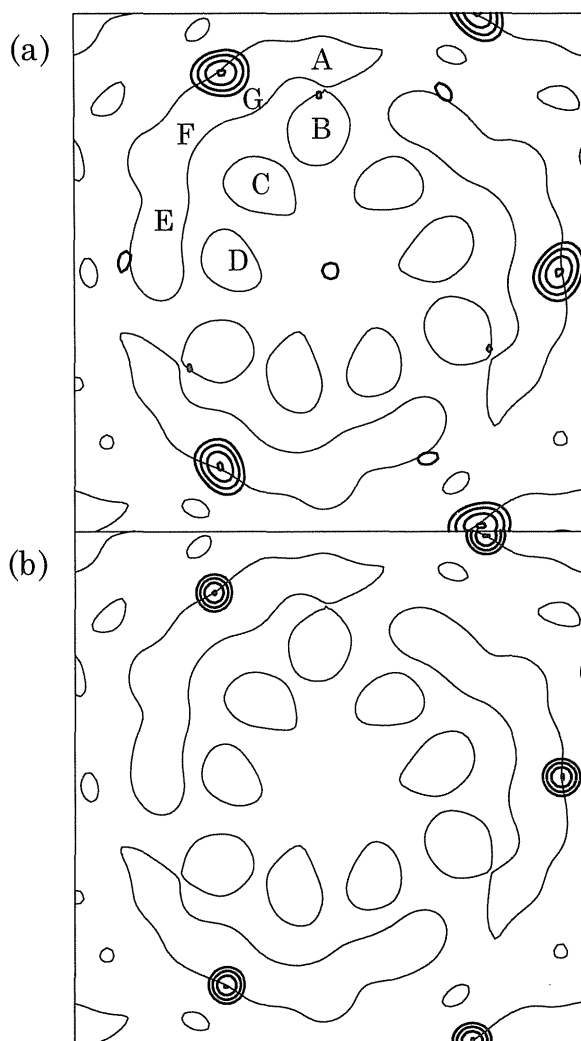


Figure 7. Two dimensional difference electron density maps between PCMB-labeled and nonlabeled I222C¹⁷⁾. (top) before refinement, (bottom) after refinement. The thin line is an outline of the bR molecule. Each helix is labeled.

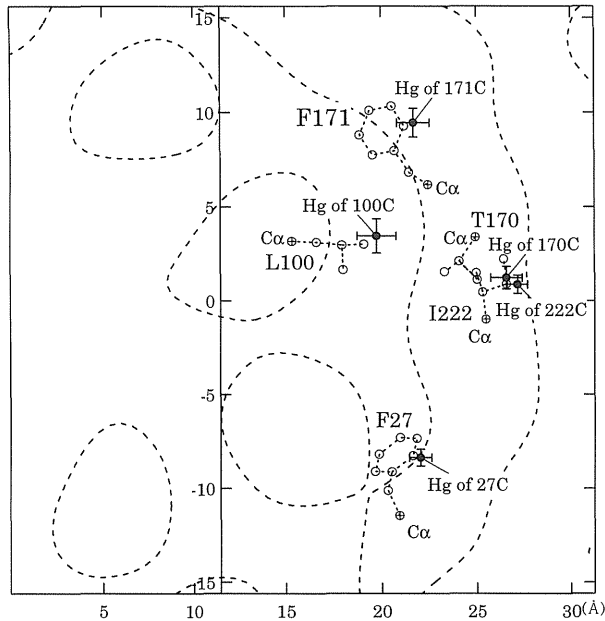


Figure 8. The determined mercury positions, with the atoms of the residues that are substituted with cysteine¹⁷⁾. The coordinates of each atom of the relevant residues are taken from Grigorieff et al.⁶⁾. A filled circle indicates mercury position, and an open circle is the position of atoms of the relevant residues in wild type. The dashed line is outline of bacteriorhodopsin.

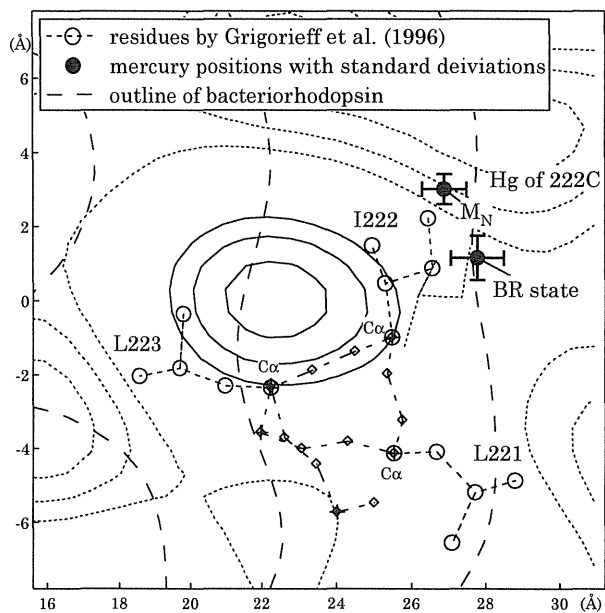


Figure 9. Mercury atom positions are shown in the MN intermediate and the bR state¹⁸⁾. Error bars of position are also indicated. Wild type bR residues⁶⁾ from the 221st to the 223rd residues are shown. Solid line and dotted line are positive and negative density changes between MN intermediate and the bR state. The dashed line is outline of helix.

クスに位置する I222C に着目した。I222C は塩酸グアニジン処理により、光照射下で MN 中間体が蓄積される。Fig. 9 は、明らかになった暗状態及び MN 中間体での水

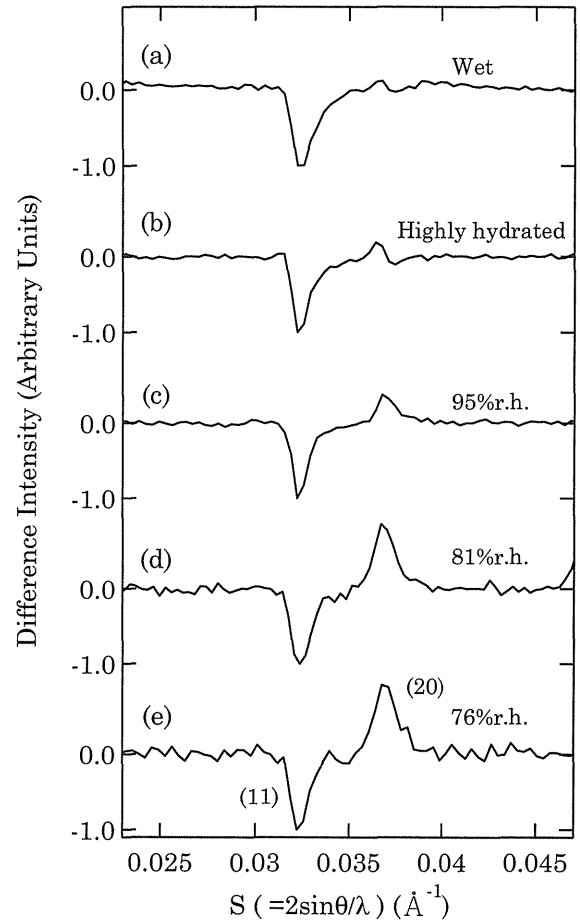


Figure 10. Difference X-ray diffraction profiles in the low-angle region that includes the (11) and (20) Bragg reflection¹⁹⁾. For comparison, the profiles are normalized by adjusting the amplitude of the (11) reflection to 1. (a) fully hydrated sample obtained by soaking; (b) fully hydrated sample obtained by placing a drop of buffer solution for 1h; (c) 95% relative humidity; (d) 81% relative humidity; and (e) 76% relative humidity.

銀の位置を示したものである¹⁸⁾。実線及び点線は Fig. 4 に示された正の変化及び負の変化を表している。また、G ヘリックスの主鎖と I222 及びその近傍のアミノ酸も示してある。水銀の位置変化の膜面に投影した成分の大きさは、 $2.1 \pm 0.8 \text{ \AA}$ であった。この結果から直ちに、G ヘリックスの変化は、細胞質側でも起きていることが結論できる。水銀の位置変化のベクトルは、G ヘリックスの中心と正の電子密度変化の中心を結ぶ線に平行である。少なくとも、G ヘリックスの細胞質側は光反応中間体において、F ヘリックスの方向への動きがあることを示している。ヘリックスに回転の動きがあるかどうかを調べるために、現在 L223C や L221C についても同様の測定を試みている。水銀修飾法は、低分解能の回折データから、 1 \AA の精度で、アミノ酸レベルでの変化を電子密度図上にマッピングする有力な方法といえる。この方法は、膜蛋白質の構造研究に広く応用できると考えている。

4. M 中間体から N 中間体への構造転移

上述のように、M 中間体と N 中間体では、構造が微妙に異なっている。しかし、これらはそれぞれ異なる化学処理法や変異体を用いて得られた構造であり、同じ試料で M 型の構造と N 型の構造をとりうるのかどうかは、必ずしも明らかではない。

M 中間体では、SB は脱プロトン化しており、D96 からプロトンを受け入れる状況になっているはずである。一方、N 中間体では SB は再プロトン化しており、D96 は解離しているかあるいは細胞質側からプロトンを受け入れる状態になっているであろう。もし、M 中間体の時に、細胞質側のチャンネルが完全に開いてしまっていれば、D96 は、細胞質側の溶媒へプロトンを解離してしまうだろう。したがって、M 型と N 型の構造の違いは、プロトンポンプ機構を考える上で本質的であると思われる。M 型構造では、まだ D96 の周辺は疎水的であるが、N 型ではチャンネルがあいているため親水的になっているはずである。すなわち、M 型と N 型とでは水和状態が異なっていると推測した。そこで、D96N を用いて光反応中間体の構造の相対湿度依存性を調べた。その結果、高い相対湿度の時は N 型構造をとり、低い相対湿度の時は M 型構造をとることが示された¹⁹⁾。Fig. 10 は低角側の反射強度の相対湿度依存性を示す。(11) 反射強度に対する (20) 反射の相対強度が高湿度の時は小さく、低湿度の時は大きい。この特徴は、それぞれ N 中間体、M 中間体での回折強度変化と一致している。実際、FTIR スペクトルも低湿度の時は M 中間体の生成を、高湿度の時は N 中間体の生成を示した。

塩酸アルギニン処理をした野生型 bR を用いて同様の測定を行った結果、野生型 bR でも確かに、M 型構造から N 型構造への転移は水和依存的であり、上述の我々の考察が正しかったことを意味している (Fig. 15)。

5. 光構造変化の時間分解測定の可能性

これまでの測定は、全て特定の反応中間体を蓄積して行われたものである。ここまで明らかになると、実際の光反応サイクルの間にこれらの構造をとるのかどうかを検証することが必要になってくる。我々は、放射光実験施設の BL15A で、一次元の PSPC を用いて、時間分解測定を試みてきたが、変化の大きい(11)や(20)の反射強度の時間変化を観測することがせいぜいであった⁴⁾。その後、CCD 検出器が利用可能になり、SPring-8 が稼動し出したことで、状況は大いに変わった。

我々は、手始めに MN 中間体が長寿命化する D96N 変異 bR を用いて、SPring-8/BL45XU において時間分解測定を行った。フラッシュランプ励起により光反応を開始させ、回折像の変化をイメージインテンシファイアと CCD カメラを組み合わせた検出系により記録した。これまでに 4 msec, 30 msec, 36 msec, 122 msec 等の時間分解能で、実時間測定を行っている。得られたデータは特異値分解法 (SVD 法) を用いて解析した。Fig. 11 は SVD 解析の結果得られた有意な成分を示している。U スペクトルは回折像を、V スペクトルは時間変化を示す。D96N 変異 bR の構造崩壊過程は二つの変化成分を含むことが明らかである。速い変化成分と遅い成分を回折像から再構成し、差電

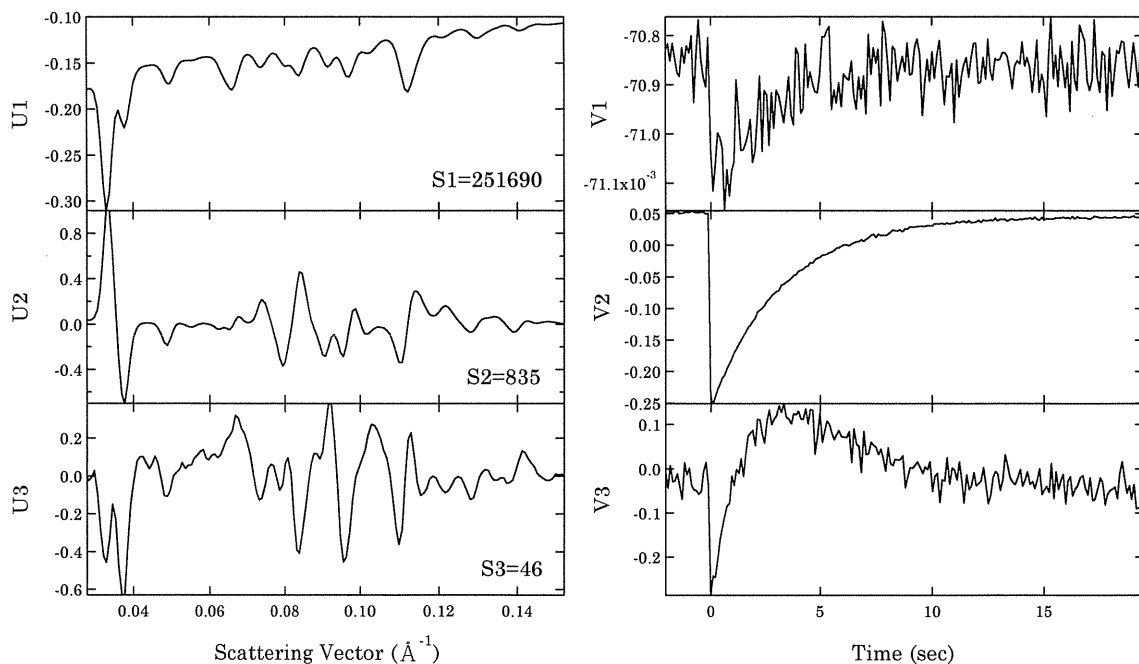


Figure 11. The results of SVD analysis for the time-resolved X-ray diffraction experiment for D96N bR (T. Oka, unpublished result).

子密度図を作ることができる (Fig. 12)。速い成分では、Bヘリックスに大きな変化が見られるが、これはM型構造の特徴である。一方、遅い成分ではF, Gヘリックスに変化が見られるN型構造の特徴を示している。これらから、実際の光反応サイクルにおいても、M型とN型の両構造がこの順序で出現していることが明らかとなった。野生型 bR についての同様の測定は、現在進行中である。

6. プロトンの輸送経路

光反応サイクルの途上で、bRは構造変化を示すことが明らかになった。この構造変化は、プロトンポンプ機構のように関係しているのであろうか。プロトンポンプ機構を考える前に、分光学的あるいは生化学的にこれまでに明らかにされている各中間体での反応について、まとめておこう (Fig. 13)。光吸収により、発色団レチナールは全トランス型から13シス型に異性化する。この反応はK中

間体生成以前に完了している。LからMへの過程で、SBのプロトンがD85に受け渡される。この時、細胞外側へプロトンが放出される。プロトン放出の詳細な過程はいまだに不明である。MからNへの過程で、D96のプロトンがSBに受け渡され、SBが再プロトン化される。Nにおいて、D96は細胞質側からプロトン化される。N以降の過程で、D85は再解離する。こうして、光反応サイクルが完了する。上述の構造変化は、このプロトン移動の方向性を決定していると考えられる。

7. 構造変化の原因

構造変化の直接の引き金を明らかにすることは、構造変化とプロトン輸送との関係を明らかにする上で、重要なことである。光反応はレチナールの異性化に始まるため、レチナールと蛋白質の立体化学的な相互作用、あるいは力学的な相互作用が構造変化の主因であるとする考えは根強か

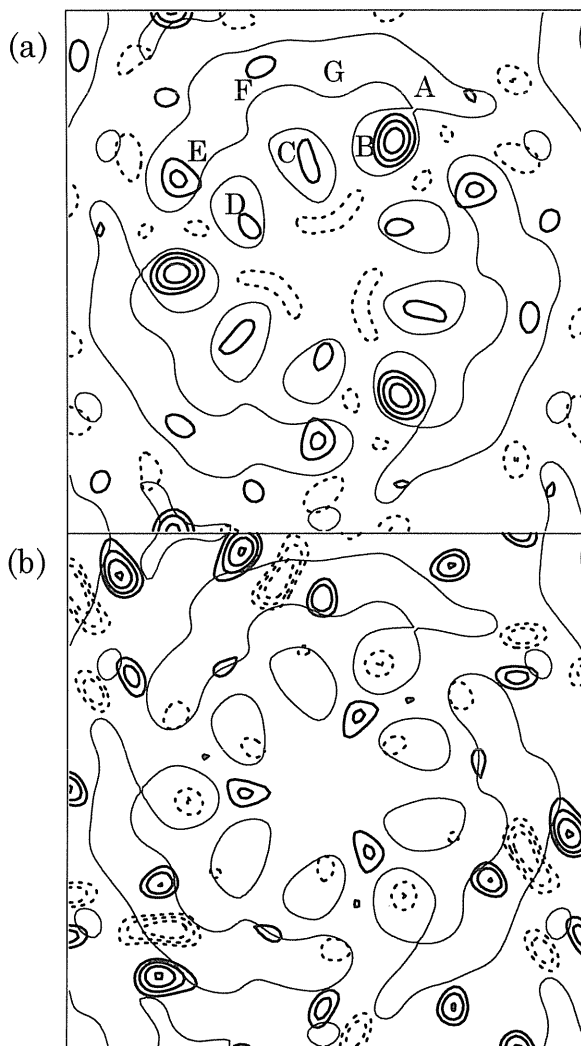


Figure 12. The difference electron density maps obtained by SVD analysis (T. Oka, unpublished result). (a) fast component, (b) slow component.

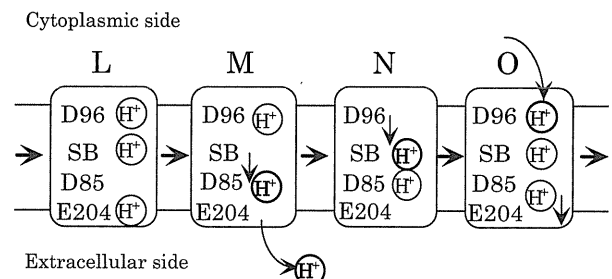


Figure 13. The chemical reactions occurred at each photointermediate during the photoreaction cycle.

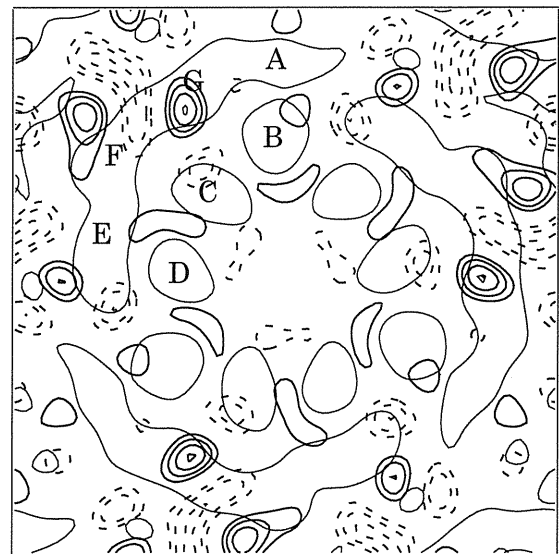


Figure 14. Two-dimensional difference electron density map of D85N between alkaline pH and neutral pH (H. Kamikubo, unpublished result). Solid line and dotted line indicate positive and negative density changes, respectively. The outline of bR molecule is superimposed.

った。しかし、一般のイオンポンプを考えた時、レチナールのような発色団やリガンドを結合している方がまれである。我々は、ポンプ機構の本質は共通、すなわち運ばれるイオンの結合部位でのイオンに対する親和性と、チャンネルの開口部位が密接に関連しているのだろうと考えた。bRの場合、レチナールの異性化よりは、SBの脱プロトン化が構造変化の主因になっているだろうと推測していた。bRでは、レチナールの異性化に引き続いて、SBの脱プロトン化が起きるため、この両者を分離して測定することが難しい。ところが、D85N変異bRは、光反応を起こさ

ないものの、溶媒のpHをかえることで、SBの脱プロトン化が起きることが明らかにされた²⁰⁾。アルカリpHでD85NのSBは脱プロトン化しており、M中間体様の吸収スペクトルを示す。そこで、D85Nの構造のpH依存性を調べた。Fig. 14はアルカリpHと中性pHの回折強度の差から求めたD85Nの差電子密度図である。F, G両ヘリックスの周辺で構造変化が起きており、MN中間体での構造変化に類似している²¹⁾。野生型bRでは、同じpHの間で回折像に有意な差は観測されない²¹⁾。以上の結果から、光反応中間体での構造変化は、SBの脱プロトン化に

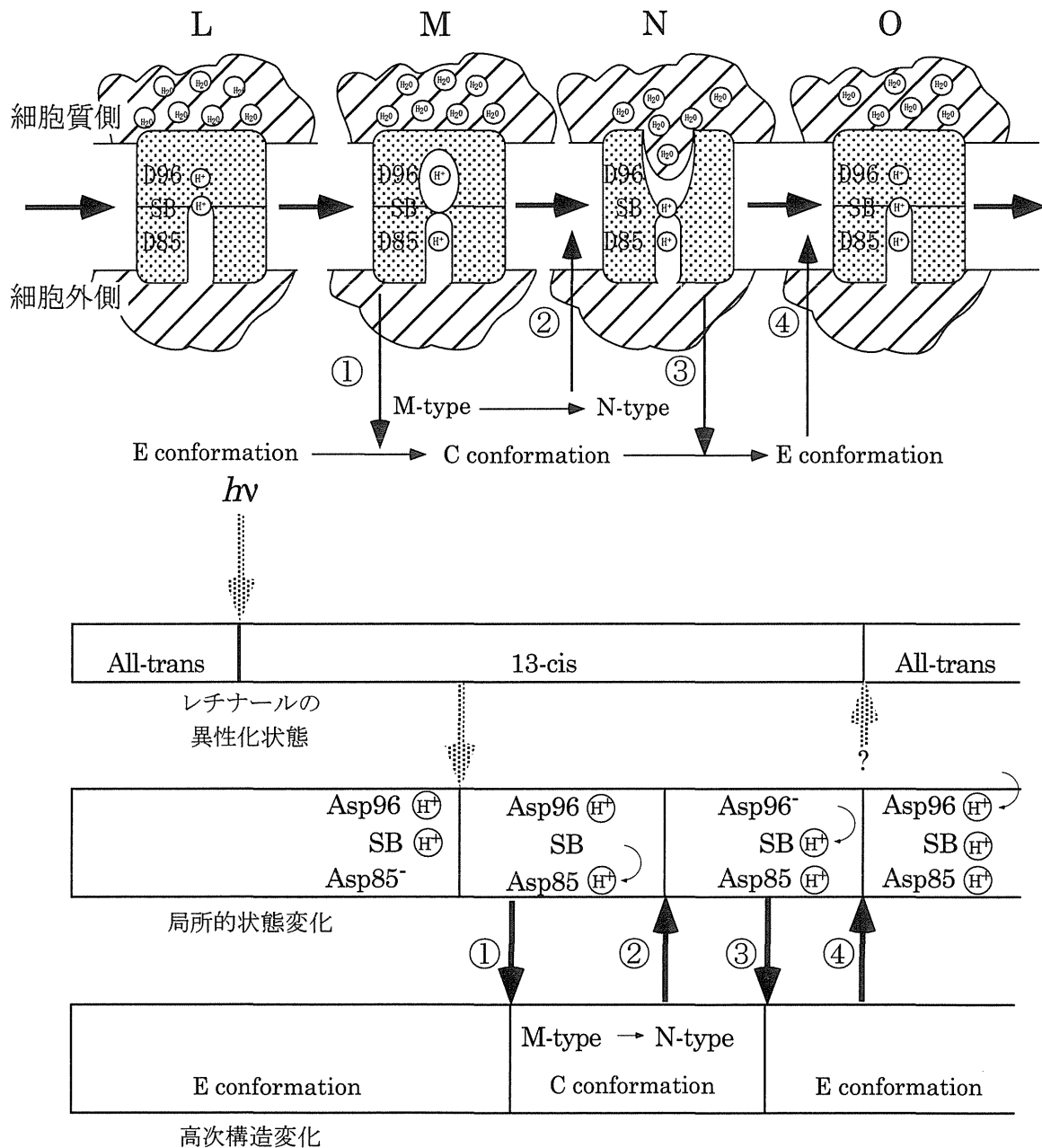


Figure 15. The proposed model to explain the vectorial proton transport of bR. (top) conceptual and schematic model that stresses the protonation states of important sites for proton transfer, channel access side and water, (bottom) relationship among retinal isomer, local electric and protonation states and global conformation.

よって引き起こされることが明らかになった^{21,22)}。

8. プロトン輸送の機構

光反応中間体の構造研究の結果は、以下のようにまとめられる。(a) M 及び N 中間体では構造変化が、細胞質側のチャンネルで起きる。(b) M 型構造から N 型構造への転移は水和依存性である。(c) 実際の光反応サイクルでは、M 型構造の形成に引き続いて N 型構造が形成される。(d) これらの構造変化は、SB の脱プロトン化によって引き起こされる。

M や N の光反応中間体では、細胞質側のチャンネルが開こうとしている、あるいは開いている状態になっている。そこで、我々是对応する構造を C 構造と呼ぶことにする。一方、暗状態では、チャンネルはむしろ細胞外側に開いている。これを E 構造と呼ぶことにする。これらの結果に基づき提案された我々のプロトン輸送機構のモデルを Fig. 15 に示す。このモデルの基礎は次の 3 つの実験事実、及び実験事実に基づく仮定である。

- (1) bR は基本的に、E 構造と C 構造の二つの異なる構造状態をとりうる。
- (2) E 構造はプロトン化 SB を、C 構造は脱プロトン化 SB をより安定化する構造である。
- (3) プロトン化 SB は E 構造への転移を、脱プロトン化 SB は C 構造への転移を引き起こす。

C 構造には、M 型構造や N 型構造のサブステートがある。一般に、蛋白質内部の特定のアミノ酸の微環境は、立体構造形成によりはじめて決定されるので、(2) の仮定は自然なものである。特に、前半部は実際に保障されている。(3) の仮定のうち後半部は本実験によって確かめられている。

プロトン輸送機構は次のように説明できる。レチナルの異性化に引き続く SB の脱プロトン化により、E 構造から C 構造への転移が起きる (Fig. 15 の①の過程)。この途上で、D96 と SB の間に水素結合などによりプロトン受け渡しのための連結ができる (M 型構造)。細胞質側のチャンネルが開くことにより、D96 の pK が下がり、SB を再プロトン化する (②)。再プロトン化された SB は、E 型構造への転移を引き起こす (③)。細胞質側のチャンネルが閉じ、D96 の微環境が疎水的になるため、D96 は再プロトン化する (④)。

このモデルで、暗黙に考えていることは、蛋白質の立体構造は局所的な構造 (アミノ酸周りの微環境) を決定し、逆に局所的な構造変化あるいは化学反応 (アミノ酸の解離など) は立体構造変化を引き起こすというように、立体構造と局所構造が密接に関係しあっている、ということである。我々のモデルでは、E 構造から C 構造への転移が先に起きたとしても、プロトンを輸送することを主張する。プロトン ATPase では、実際にこのようなことが起きているのではないかと期待している。今後、局所的な構造変

化や反応がどのようにして、立体構造の変化を引き起こすのかといった問題を明らかにしていく必要がある。さらに、我々のモデルによって、他の蛋白質の機能発現機構を説明することも、モデルの検証にとって必要であろう。形の変化といった低分解能構造だけを見ていても、逆に高分解能の立体構造だけを見ていても、機能発現機構は理解できない。蛋白質の機能発現機構の理解のためには、様々なレベルでの詳細な構造研究が必要であり、そのために放射光の果たす役割は大きいと思われる。

本文を終えるにあたり、これまで研究にご協力いただいた多くの方々、特に、塩酸アルギニン処理法を考案し M 中間体の構造解析を行った中迫雅由博士 (現東大・分生研)、研究立ち上げ時に努力された佐藤直紀博士 (現(株)花王)、放射光実験施設 BL15A での実験に協力いただいた雨宮慶幸教授 (東大・工)、Spring-8 での時分割実験に協力いただいている八木直人博士 (JASRI) と藤澤哲郎博士 (理研)、終始変わらぬサポートをいただいた徳永史生教授 (阪大・理)、変異体の作成への協力と有意義な議論をしていただいた J. K. Lanyi 教授 (Univ. of California, Irvine) と R. Needleman 教授 (Wayne State Univ.) の各氏に心から感謝の意を表したい。

参考文献

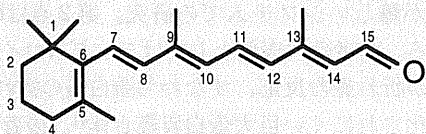
- 1) 片岡幹雄: 生物物理 **27**, 296 (1987).
- 2) 片岡幹雄: 生物物理 **31**, 293 (1991).
- 3) 片岡幹雄: 生物物理 **33**, 31 (1993).
- 4) 片岡幹雄: 生物物理 **35**, 239 (1995).
- 5) 片岡幹雄: “蛋白質のかたちと物性” (中村春木, 有坂文夫編) (共立出版, 1997), 204.
- 6) N. Grigorieff, T. A. Ceska, K. H. Downing, J. M. Baldwin and R. Henderson: *J. Mol. Biol.* **259**, 393 (1996).
- 7) Y. Kimura, D. G. Vassilyev, A. Miyazawa, A. Kidera, M. Matsushima, K. Mitsuoka, K. Murata, T. Hirai and Y. Fujiyoshi: *Nature* **389**, 206 (1997).
- 8) H. Luecke, H. T. Richter and J. K. Lanyi: *Science* **280**, 1934 (1998).
- 9) M. Nakasako, M. Kataoka and F. Tokunaga: *FEBS Lett.* **254**, 211 (1989).
- 10) M. Nakasako, M. Kataoka, Y. Amemiya and F. Tokunaga: *FEBS Lett.* **292**, 73 (1991).
- 11) H. Kamikubo, M. Kataoka, G. Váró, T. Oka, F. Tokunaga, R. Needleman and J. K. Lanyi: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 1386 (1996).
- 12) S. Subramaniam, M. Gerstein, D. Oesterhelt and R. Henderson: *EMBO J.* **12**, 1 (1993).
- 13) J. Vonck: *Biochemistry* **35**, 5870 (1996).
- 14) N. A. Dencher, D. Dresselhaus, G. Zaccai and G. Büldt: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 7876 (1989).
- 15) M. H. Koch, N. A. Dencher, D. Oesterhelt, H.-J. Plöhn, G. Rapp and G. Büldt: *EMBO J.* **10**, 521 (1991).
- 16) J. Sasaki, Y. Shichida, J. K. Lanyi and A. Maeda: *J. Biol. Chem.* **267**, 20782 (1992).
- 17) T. Oka, H. Kamikubo, F. Tokunaga, J. K. Lanyi, R. Needleman and M. Kataoka: *Photochem. Photobiol.* **66**, 768 (1997).
- 18) T. Oka, H. Kamikubo, F. Tokunaga, J. K. Lanyi, R. Needleman and M. Kataoka: *Biophys. J.* **76**, 1018 (1999).
- 19) H. Kamikubo, T. Oka, Y. Imamoto, F. Tokunaga, J. K.

- Lanyi and M. Kataoka: *Biochemistry* **36**, 12282 (1997).
- 20) G. J. Turner, L. J. W. Miercke, T. E. Thorgeirsson, D. S. Kliger, M. C. Betlach and R. M. Stroud: *Biochemistry* **32**, 1332 (1993).
- 21) M. Kataoka, H. Kamikubo, F. Tokunaga, L. S. Brown, Y. Yamazaki, A. Maeda, M. Sheves, R. Needleman and J. K. Lanyi: *J. Mol. Biol.* **243**, 621 (1994).
- 22) L. S. Brwon, H. Kamikubo, L. Zimányi, M. Kataoka, F. Tokunaga, P. Verdegem, J. Lugtenberg and J. K. Lanyi: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 5040 (1997).
- 23) P. J. Kraulis: *J. Appl. Cryst.* **24**, 946 (1991).

キーワード

レチナール

ビタミンAのアルデヒドで、バクテリオロドプシンのみならず、我々の眼の網膜に存在する光受容物質（視物質）の発色団である。長い共役鎖があり、二重結合部位で、トランス-シス異性化が可能である。バクテリオロドプシンでは暗状態は図に示す全トランス型であり、13シス型へ光異性化する。一方、視物質では暗状態では11シス型であり、全トランス型へ光異性化する。



シッフ塩基

一般式 $RCH=NR'$ で示される化合物の総称で、アルデヒドと第一級アミンの縮合で得られる。バクテリオロドプシンの場合、レチナールのアルデヒド基と216番目のアミノ酸のリジンの側鎖のアミンの間で形成されており、この時窒素がプロトン化されている。光反応サイクルでは、このプロトンが脱プロトン化される。

イオンポンプ

プロトンに限らず、生体では、細胞の内外でイオンの濃度差が形成されている。例えば、プロトンやナトリウムイオンの濃度は細胞外が高く、カリウムイオンの濃度は細胞内の方

が高い。細胞膜は、イオンの絶縁膜の役目を果たしている。濃度勾配に従って流れ込むイオンの通り道がチャネル蛋白質であり、逆に濃度勾配に逆らってイオンを運ぶ蛋白質がイオンポンプである。イオンポンプの働きによって、イオン濃度差が維持されている。バクテリオロドプシンは、光エネルギーを利用して、プロトンを細胞外に運び出すため、光駆動プロトンポンプと呼ばれる。

特異値分解法 (Singular Value Decomposition (SVD) 法)

一般に m 行 n 列の行列 A は、 m 行 n 列の行列 U 、 n 行 n 列の行列 V 、 n 行 n 列の行列 S を用いて、 $A=USV^T$ と表すことができる。ここで、 $U^T U=I_n$ 、 $V^T V=I_n$ (ただし、 I_n は n 行 n 列の単位行列) である。また、 S は非負の成分を持つ対角行列である。

時間分解 X 線回折データは、時間 t 依存成分と逆空間 q 依存成分を行列とするデータ行列 A で以下のように書くことができる。

$$A_{ij}=A(q_i, t_j)=\sum f_k(q_i)c_k(t_j)$$

すなわち、 $A=FC^T$ である。

これを上の関係に代入して、 U 及び V を求めると、 $US=FR$ 、 $V=CR$ (ただし、 $R^T R=I_n$) となり、回折像の変化成分 F と時間変化成分 C を分離して得ることができる。