

■第11回日本放射光学会奨励賞受賞報告

時分割 X 線回折法による紫膜の光反応過程の研究

岡 俊彦 (慶應義塾大学理工学部)

第3世代の放射光の登場により X 線強度が増加し、さらに CCD に代表される検出器などの測定装置の進歩もあり、時分割 X 線回折散乱測定を行いやすい環境が整ってきている。この手法では試料に大量の X 線を照射することになるため X 線によるダメージを十分注意する必要があるが、さまざまな試料の反応機構の解明において有効な手法となっている。

生体試料を対象にした時分割 X 線回折散乱測定において代表的な手法は次の3つがある。

- ① 試料に連続的に X 線を照射し、反応中の回折散乱の変化を検出器で連続的に取り込む。
- ② 反応開始後、遅延をおいて試料に X 線パルスを照射し回折散乱を測定する。
- ③ X 線照射位置で試料の反応を(見かけ上)とめて回折散乱を測定する。

①は最も標準的な手法であるが、時間分解能は検出器のデータ取り込み時間に依存する。とくに2次元の CCD 検出器を使用した場合、時間分解能はミリ秒から秒程度になってしまう。②の方法は時間分解能が反応開始トリガと X 線パルスの時間幅に依存する。このためトリガの時間幅が十分狭ければ、原理的には蓄積リングのシングルバンチからの X 線での測定も可能である。しかし一回の反応で1イメージの回折散乱しか測定できないため、遅延を変えながら測定を繰り返す必要がある。このため試料は繰り返し反応するものか、交換が容易で大量に準備できるものになってしまう。①と②について(特に①に関して)八木による総説がある¹⁾。③は反応中の試料を移動させながら測定する手法である。たとえばフローセルを用いた X 線溶液散乱などがこれにあてはまるが²⁾、この場合時間分解能は溶液の混合時間に依存する。

本研究では上記の①と②の手法を用いて行った紫膜の時分割 X 線回折測定を行った。紫膜は高度好塩菌の細胞膜上に存在し、バクテリオロドプシン(BR)と呼ばれる膜蛋白質の2次元結晶で構成されている。このBRは光を吸収して水素イオンを細胞内から細胞外へ輸送し、高度好塩菌の細胞の内外に水素イオン勾配を作り出す。このためBRは一分子からなる最も単純な光-エネルギー変換システムといえる。光を吸収して水素イオンを輸送する過程で、BRは主に吸光度変化で識別される反応中間体、K, L, M, Nなどを経て反応前の状態に戻る(Fig. 1a)。これらの中間体はBR内に存在するレチナールと呼ばれる光を吸収する色素の状態とその近傍の蛋白質の状態を反映している。

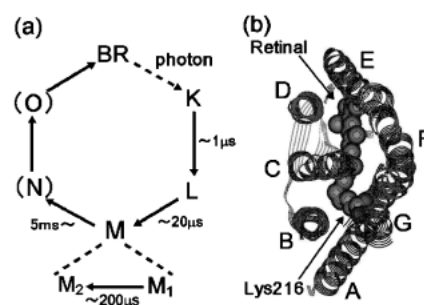


Fig. 1 (a) Photocycle of bacteriorhodopsin. M intermediate is revealed to have two structurally different states, M1 and M2. (b) Structure of bacteriorhodopsin from cytoplasmic side of membrane. A retinal is connected to Lys216 located in G helix.

しかしレチナールから20 Å程度離れた細胞膜表面への水素イオン輸送を可能とするためには、7本のαヘリックスと呼ばれる棒状の構造単位からなるBR自身が大きく構造変化することが要求される(Fig. 1b)。この吸光度変化と構造変化とのかかわりを調べるのが本研究の目的である。試料は紫膜を高分子などの膜上に多数配向させたものを用いた。これに X 線を照射することにより~7 Å分解能の粉末様回折が得られる。この分解能では蛋白質に含まれる個々のアミノ酸の変化を識別することは難しいが、αヘリックスなど2次構造の変化を調べることができる。

M 中間体から N 中間体での構造変化 ~ミリ秒分解能測定

BRの光反応過程ではM中間体とN中間体で始状態に比べて大きな構造変化がおきることが分かっていた。しかし光反応を止めた測定からは、M中間体とN中間体での大きな構造変化の有無について相反する実験結果が報告されていた^{3,4)}。このため、我々はこの遷移過程での構造変化を調べるために、SPring-8のBL45XU小角散乱ステーションにおいて紫膜のミリ秒分解能 X 線回折実験を行った⁵⁾。試料条件をM中間体からN中間体への遷移が観測しやすいpH 9, 10°Cとした。波長1.000 Åの X 線を連続的に照射し、浜松ホトニクス製6インチ X 線イメージインテンシファイア付 CCD カメラ(C4880-82)により時間分解能244ミリ秒で回折像を記録しながら、フラッシュ照射し光反応を開始させ、反応過程での構造変化を測定した。

この結果、始状態の構造とともに、M中間体、N中間

体がヘリックスレベルで区別可能な構造を持つことが分かった。また2次元投影差電子密度図より、M中間体が主要な速い成分のものは始状態に比べGヘリックスのみが大きく変化していたのに対し、N中間体が主要と考えられる遅い成分のものはF、Gヘリックス近傍が大きく変化していた。これはM→N遷移でFヘリックスが大きく変化することによる。

また変異型BRのD96NではM中間体に続いて、レチナルの状態がM中間体で蛋白質全体の構造としてはN中間体に近いMN中間体を経る。この変異型を用いて、M中間体からMN中間体への遷移を36ミリ秒分解能で測定したところ、野生型BRのM→N遷移で観測された変化と同様の構造変化を観測した⁶⁾。これはN中間体の生成過程で、N中間体様の構造が先に生成した後、レチナルが再び水素イオンを結合することを示唆している。

マイクロ秒分解能 X線回折測定システム

検出器の分解能に依存しない時間領域での測定を行うために、SPring-8のBL40XUにマイクロ秒時分割X線回折測定システムを構築した^{7,8)}。回転式シャッターを用いて6マイクロ秒の幅を持つX線パルスを作成し、開閉式シャッターで1パルスのみ取り出せるようにした。さらにレーザーと同期を取り、検出器にX線イメージインテンシファイア付CCDカメラを用いて光反応過程でのX線回折の変化を測定できるようにした。この結果、最高6マイクロ秒の時間分解能を持つシステムを構築できた。

M1中間体からM2中間体での構造変化 ～マイクロ秒分解能測定

M中間体は、その生成過程ではレチナルの水素イオンを細胞外側に受け渡し、また崩壊過程では細胞質側から水素イオンを受け取るため、光反応の鍵となる中間体だと考えられている。先述したM中間体で観測される構造変化は、分光測定との比較をもとに、M1中間体からM2中間体への過程で起こると一部で考えられていた。しかしM1からM2への遷移過程を観測した実験で大きな構造変

化を直接示す実験は行われていなかった。この遷移過程の直接測定を、マイクロ秒時分割X線回折測定システムを用いて行った⁹⁾。紫膜試料は野生型BRの紫膜(pH7)で、温度は25°Cで測定した。この試料に対しYAGレーザー(532nm)で反応を開始させ、遅延をおき幅6マイクロ秒のX線を照射した(Fig.2)。レーザー照射からX線照射までの遅延を5マイクロ秒から500ミリ秒まで変えることにより一連のデータとした。

その結果BRの光反応過程でX線回折強度の変化が観測された。特異値分解による解析から、X線で観測された光反応過程には一つの間mediate構造が存在することが分かった。この中間体構造は反応開始後5ミリ秒で蓄積比率が最大となった(Fig.3a)。一方吸光度測定から求まるM中間体の蓄積では、400マイクロ秒に最大を持ち、5ミリ秒付近に肩を持つ(Fig.3b)。この不一致はBRがM中間

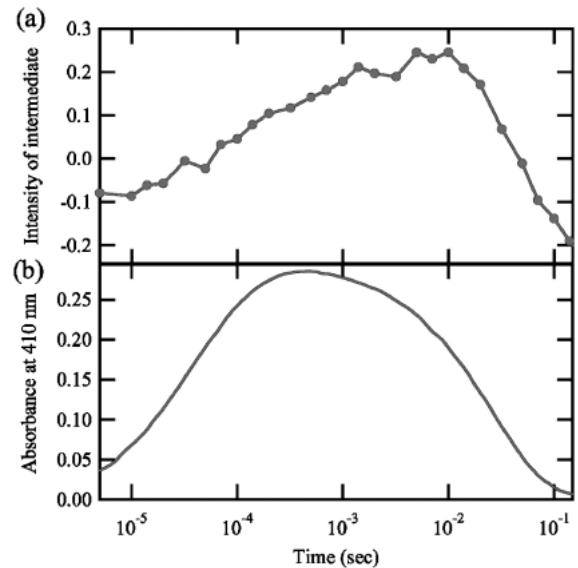


Fig. 3 (a) Time-course of intensity changes in X-ray diffraction. The time-course corresponds to amount of intermediate state that has different structure from original state. (b) Time-course of absorbance at 410 nm, which corresponds to amount of M intermediate.

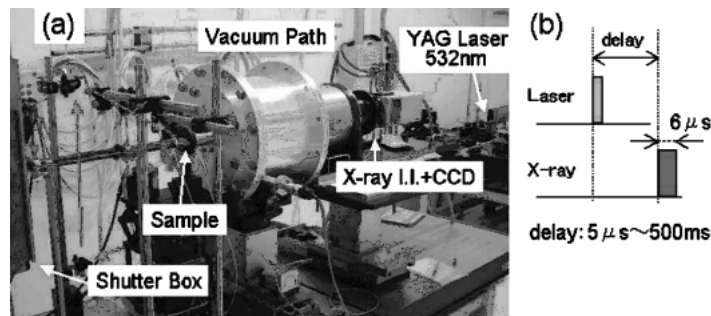


Fig. 2 (a) A photograph of experiment system. (b) A sequence of laser and X-ray. Delay is changed to record time-dependent diffraction change in photocycle.

体で均一な構造を持っているのではなく、構造変化の量が少ない M と構造変化量が多い M が存在することを示している。つまり M 中間体の中で構造変化が起こっていることを示すものであり、M1 から M2 への遷移過程で大きな構造変化が起こることを示唆する (Fig. 1a)。この実験により M1-M2 での構造転移をはじめて直接的に示すものとなった。

謝辞

本研究は多くの方々との共同研究によるものです。心より感謝いたします。八木直人博士、井上勝晶博士（高輝度光科学研究センター）には、研究全般に渡って多大なご支援を頂きました。片岡幹雄教授（奈良先端科学技術大学院大学）には紫膜の研究についてご指導いただきました。また野生型 BR を用いたミリ秒時分割実験については、藤澤哲郎博士（理化学研究所）、徳永史生教授（大阪大学）、上久保裕生博士（奈良先端科学技術大学院大学）と共同で行いました。また SPring-8 の方々の有形無形のご支援に深く感謝します。

参考文献

- 1) 八木直人：放射光 **19**, 349-355 (2006).
- 2) S. Akiyama, S. Takahashi, T. Kimura, K. Ishimori, I. Morishima, Y. Nishikawa and T. Fujisawa: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 1329-1334 (2002).
- 3) H. Kamikubo, T. Oka, Y. Imamoto, F. Tokunaga, J. K. Lanyi

and M. Kataoka: *Biochemistry* **36**, 12282-12287 (1997).

- 4) S. Subramaniam, M. Lindahl, P. Bullough, A. R. Faruqi, J. Tittor, D. Oesterhelt, L. Brown, J. Lanyi and R. Henderson: *J. Mol. Biol.* **287**, 145-161 (1999).
- 5) T. Oka, N. Yagi, T. Fujisawa, H. Kamikubo, F. Tokunaga and M. Kataoka: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 14278-14282 (2000).
- 6) T. Oka, N. Yagi, F. Tokunaga and M. Kataoka: *Biophys. J.* **82**, 2610-2616 (2002).
- 7) 岡 俊彦, 井上勝晶, 八木直人：放射光 **14**, 384-388 (2001).
- 8) T. Oka, K. Inoue and N. Yagi: *AIP Conf. Proc.* **705**, 1197-1200 (2004).
- 9) T. Oka, K. Inoue, M. Kataoka and N. Yagi: *Biophys. J.* **88**, 436-442 (2005).

● 著者紹介 ●



岡俊彦

慶應義塾大学理工学部物理学科助手

E-mail: oka@phys.keio.ac.jp

専門：生物物理学, X線小角回折・散乱, 蛋白質結晶構造解析

【略歴】

2000年大阪大学大学院理学研究科博士課程修了(博士(理学)), 1997年日本学術振興会特別研究員(DC1), 2000年理化学研究所基礎科学特別研究員, 2001年勲高輝度光科学研究所研究員を経て2003年より現職。